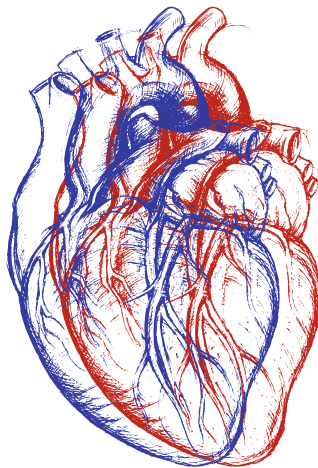


Koronararterien-Bypass

Einfluss des Spüldrucks während der Präparation der
Vena saphena magna auf deren Bypass-Qualität

Sebastian Bader



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Koronararterien-Bypass -
Einfluss des Spüldrucks während der Präparation der
Vena saphena magna auf deren Bypass-Qualität

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Sebastian Bader
aus Ludwigshafen am Rhein

Gießen 2017

Aus der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim

Abteilung für Herzchirurgie

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. T. Walther

in Kooperation mit der
Arbeitsgruppe "Experimentelle Kardiologie"

Franz-Grödel-Institut

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. C. Hamm

Gutachter: Prof. Dr. Lochnit

Gutachter: Prof. Dr. Kracht

Tag der Disputation: 17. August 2017

“Doch Forschung strebt und ringt, ermüdend nie,
nach dem Gesetz, dem Grund, Warum und Wie.”

Johann Wolfgang von Goethe
Dt. Dichter und Naturwissenschaftler

- Meiner Familie -

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die koronare Bypass-Operation	3
1.1.1	Ablauf der CABG	4
1.1.2	Transplantate zur CABG	5
1.2	Vein Graft Disease	6
1.2.1	Akute Thrombose	8
1.2.2	Intima Hyperplasie	10
1.2.3	Atherosklerose	11
1.2.4	Prävention der VGD	12
1.3	Zusammenfassung und Zielsetzung	14
2	METHODEN	15
2.1	Versuchsbeschreibung	15
2.2	Patientenkollektiv	16
2.3	VASOSHIELD – Spritze mit Druckkontrolle	16
2.4	Vorgehen bei der Operation	18
2.5	Postoperative Probenverarbeitung	20
2.6	Histologie und Immunhistochemie	22
2.6.1	Herstellung beschichteter Objektträger	22
2.6.2	Anfertigung der Gefrierschnitte	22
2.6.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	22
2.6.4	Immunhistochemie	23
2.6.4.1	Färbeprotokolle	24
2.6.5	Mikroskopie	26
2.6.5.1	Lichtmikroskopie und Auswertung	26
2.6.5.2	Fluoreszenzmikroskopie	27

2.7 Molekularbiologische Verfahren	27
2.7.1 Relative quantitative Analyse von RNA	27
2.7.1.1 RNA-Isolation	28
2.7.1.2 Konzentrationsbestimmung der RNA	29
2.7.1.3 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)	30
2.7.1.4 Targets & Primer-Auswahl	31
2.7.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion	31
2.7.1.6 Quantitative Real-Time PCR	33
2.7.2 Semi-Quantitative Analyse von Proteinen (Western-Blot)	36
2.7.2.1 Proteinisolierung aus Gewebestücken	36
2.7.2.2 Quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration	36
2.7.2.3 SDS-Gelelektrophorese	37
2.7.2.4 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran	38
2.7.2.5 Proteindetektion	39
2.7.2.6 Auswertung Western-Blot	40
2.8 Statistik	41

3 ERGEBNISSE **42**

3.1 Endothelintegrität	42
3.1.1 HE-Färbung	42
3.1.2 Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül	44
3.2 Adhäsionsmoleküle	48
3.2.1 Intercellular adhesion molecule 1	48
3.2.1.1 Immunfluoreszenzhistochemie für ICAM-1	48
3.2.1.2 Quantitative Real-Time PCR für ICAM-1	49
3.2.1.3 Western-Blot für ICAM-1	50
3.2.2 Vascular cell adhesion molecule 1	52
3.2.2.1 Immunfluoreszenzhistochemie für VCAM-1	52
3.2.2.2 Quantitative Real-Time PCR für VCAM-1	53
3.2.2.3 Western-Blot für VCAM-1	54
3.2.3 P-Selectin	54
3.2.3.1 Immunfluoreszenzhistochemie für P-Selectin	54
3.2.3.2 Quantitative Real-Time PCR für P-Selectin	55

3.2.3.3	<i>Western-Blot für P-Selectin</i>	56
3.3	Stickstoffmonoxid (NO)	57
3.3.1	Endotheliale NO-Synthase	57
3.3.1.1	<i>Immunfluoreszenzhistochemie für eNOS</i>	58
3.3.1.2	<i>Quantitative Real-Time PCR für eNOS</i>	58
3.3.1.3	<i>Western-Blot für eNOS</i>	59
3.4	Vergleich der qRT-PCR Ergebnisse	62
3.5	Vergleich der WB Ergebnisse	62

4 DISKUSSION UND AUSBLICK 63

4.1	Versuchsaufbau und Methodik	63
4.2	Diskussion der Ergebnisse	64
4.2.1	Endothelintegrität	64
4.2.2	Adhäsionsmoleküle	65
4.2.3	Endotheliale NO-Synthase	68
4.3	Kritikpunkte	70
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick	72

5 ZUSAMMENFASSUNG 73

6 SUMMARY 74

7 ANHANG 75

7.1	Abkürzungsverzeichnis	75
7.2	Abbildungsverzeichnis	79
7.3	Tabellenverzeichnis	80
7.4	Literaturverzeichnis	80
7.5	Material	92
7.5.1	Geräte	92
7.5.2	Verbrauchsmaterialien	94
7.5.3	Chemikalien, Reagenzien, Lösungen und Kits	95
7.5.4	Software/EDV-Programme	98
7.5.5	Antikörper	98

7.5.5.1	<i>Primär-AK Immunhistologie</i>	98
7.5.5.2	<i>Sekundär-AK Immunhistologie</i>	99
7.5.5.3	<i>Primär-AK Western-Blot</i>	99
7.5.5.4	<i>Sekundär-AK Western-Blot</i>	99
7.5.6	Primer zur Normalisierung der PCR	99
7.5.7	Taq-Man® Real-Time PCR Assays	100
7.5.8	Lösungen/Puffer	100
7.6	Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation	102
7.7	Danksagung	103

1 EINLEITUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen mit weltweit geschätzten 17,5 Millionen Toten im Jahr 2012 die häufigste aller Todesursachen dar (World Health Organization, 2014). Hiervon wiederum bildet die Koronare Herzkrankheit (KHK) mit circa 7,4 Millionen Todesfällen den größten Anteil (World Health Organization, 2014). In Deutschland verstarben im Jahr 2013 knapp 184.000 Menschen an den Folgen der KHK, was einem Anteil von ca. 21% aller Todesfälle entsprach (Statistisches Bundesamt, 2014). Nach neusten Vorhersagen der World Health Organization (WHO) wird die Inzidenz für kardiovaskuläre Erkrankungen zudem in den nächsten Jahren weltweit und besonders auf dem afrikanischen Kontinent weiter steigen (World Health Organization, 2010).

Als Folge der KHK kommt es häufig zum Myokardinfarkt (MI). Durch die verbesserte Therapie der KHK konnte die Mortalität in den letzten Jahrzehnten jedoch stetig gesenkt und seit 1980 sogar halbiert werden (Deutsche Herzstiftung, 2013). Neben der verbesserten medikamentösen Therapie stellt die Entwicklung der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) eine wichtige Rolle in der Prävention und Therapie des Myokardinfarkts dar. Hierdurch wurde die koronare Bypass Operation (CABG, coronary artery bypass grafting), welche bis dahin als Goldstandard in der Therapie der KHK galt, vor allem in der Akuttherapie abgelöst. Beide Verfahren, sowohl PTCA als auch CABG, dienen bei bestehender KHK der Vermeidung eines MI. In zahlreichen Studien wurde die Indikation für das jeweilige Verfahren untersucht. Hierbei zeigte sich die CABG bei komplexer KHK wie einer Drei-Gefäß-KHK oder bei Hauptstammeteiligung als vorteilhaft gegenüber der PTCA (siehe Tabelle 1 in Kapitel 1.1) (Windecker et al., 2014).

Trotz vermehrtem Einsatz arterieller Gefäße zur Bypassversorgung wird die Vena saphena magna (VSM) weiterhin in knapp 80% aller Bypassoperationen verwendet (AQUA, 2015). Dies ist auf die jahrelangen Erfahrungswerte mit der VSM als Bypassgefäß und ihre einfache Entnahme sowie gute Verfügbarkeit zurückzuführen. Jedoch zeigen mehrere Studien eine verminderte Offenheitsrate im Vergleich zu arteriellen Bypässen. So wird die 10-Jahres Offenheitsrate der VSM zwischen 32-71% angegeben, während im Vergleich bei einem Bypass mit der A. thoracica interna sinistra (LIMA) nach 10-Jahren noch eine Offenheitsrate von 88-95% beschrieben wird (Windecker et al., 2014). Der Nachteil venöser Bypässe in den Langzeitergebnissen ist

auf die Pathophysiologie der sog. Vein Graft Disease (VGD) zurückzuführen (siehe Kapitel 1.2).

Eine der frühesten Ursachen für eine Schädigung der Vene stellt die angewendete intraoperative Entnahmetechnik dar (Dashwood et al., 2009). Diese hat sich seit den Anfängen der Bypass-Chirurgie nicht sonderlich verändert und wird zumeist über einen offenen chirurgischen Zugang und stumpfer Präparation durchgeführt. Während der Präparation wird die Vene mit einer Flüssigkeit, zumeist heparinisiertes Blut verdünnt mit einer Kochsalz-Lösung (NaCl), gespült und gebläht um die Gefäßabgänge darstellen und ligieren zu können. Zudem wird hierdurch die Dichtigkeit überprüft und ein möglicher Vasospasmus überwunden. Einige Studien konnten zeigen, dass die Vene durch dieses Spülen sehr hohen Drücken von bis zu 600 mmHg ausgesetzt wird (Li et al., 2014). Als Folge dieses hohen Spüldrucks konnte neben einer Reduktion der Vasoreaktivität (Chong et al., 2004) und einer gesteigerten Schädigung der Endothelintegrität (Dumanski et al., 2007)(Khaleel et al., 2012)(Thatte and Khuri, 2001), eine verstärkte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen (Chello et al., 2003) gezeigt werden.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde im Jahr 2010 eine drucklimitierende Spritze (VASOSHIELD Druckregulierspritze, Maquet AG, Rastatt, D) entwickelt. Diese konnte sich jedoch aufgrund der unklaren Studienlage im klinischen Alltag nicht flächendeckend durchsetzen. Ziel dieser Arbeit ist daher die Untersuchung der Auswirkung dieser drucklimitierenden Spritze auf die Qualität des venösen Bypassgefäßes im Rahmen einer prospektiv randomisierten Studie.

1.1 Die koronare Bypass-Operation

Das Prinzip der CABG beruht auf der Umgehung einer Stenose im Koronargefäß mithilfe eines anderen Gefäßes. Bereits 1951 berichteten Vineberg und Miller über die Implantation der linken Arteria mammaria interna (LIMA) in das Myokard, die sog. „Vineberg Prozedur“ (Vineberg and Miller, 1951). Am 25. Februar 1964 war es Vasilii Kolesov der in Leningrad den ersten aufgenähten koronararteriellen Bypass mit der A. thoracica interna als Transplant auf den Ramus interventricularis anterior (RIVA) durchführte (Olearchyk, 1988). Noch im November desselben Jahres gelang es einem Team um Michael DeBakey und Edward Garrett die VSM als aorto-koronaren Bypass in fortlaufender Nahttechnik zu verwenden (Garrett H et al., 1996).

Als Vater und Pionier der Bypass-Chirurgie gilt jedoch René Favaloro. Im Mai 1967 konnte er erfolgreich einen Bypass der A. coronaria dextra (RCA, right coronary artery) mithilfe der VSM in End-zu-End-Technik durchführen (Favaloro, 1983). Er war der erste, der systematisch vorging und über die Jahre reproduzierbare Ergebnisse hervorbrachte. So konnte er bereits bis Oktober 1967 180 Patienten mit einer VSM als Transplantat versorgen (Buxton and Galvin, 2013). Innerhalb von 4 Jahren operierte er über 2000 Patienten, bei einer Mortalität von lediglich um die 3%, und leitete hierdurch die moderne Koronarchirurgie ein (Favaloro, 1971).

In den späten 1970er und frühen 1980er Jahren wurden erste Studien vorgestellt, die die Überlegenheit der CABG gegenüber der medikamentösen Therapie zeigten. So konnte die European Coronary Surgery Studie (ECSS, 1979) bei Vorliegen einer Drei-Gefäß-KHK eine signifikant bessere Überlebensrate nach einer CABG belegen (Varnauskas et al., 1979). Die CASS-Studie (Coronary Artery Surgery Study, 1981) bestätigten diese ersten Ergebnisse mit einer geringeren Mortalität nach CABG nach 5, 7 und 10 Jahren (Yusuf et al., 1994). Dieser Überlebensvorteil, war bei Beteiligung des linken Hauptstamms sowie bei KHK-Patienten mit hohem Risiko für einen MI am stärksten ausgeprägt. Erst mit Einführung und Etablierung der PTCA entwickelte sich eine Alternative zur CABG. So kam es trotz eines Anstiegs der Prävalenz der KHK und einer Verbesserung der Operationstechniken zu einem Rückgang der CABG Zahlen. In Deutschland wurden im Jahr 2013 insgesamt 54.262 CABG bei einer Gesamt-Mortalität von 2,9% durchgeführt (Funkat et al., 2014).

Beim Vergleich der beiden invasiven Therapieoptionen in der SYNTAX-Studie ergab sich eine Überlegenheit der CABG bei komplexen Koronarläsionen (Mohr et al., 2013). Für die CABG zeigten sich bei einer Drei-Gefäß-KHK oder Beteiligung des linken

Hauptstamms signifikant geringere Raten eines MI (3,8% vs. 9,7%, $p < 0,0001$) oder einer erneuten Revaskularisation (13,7% vs. 25,9%, $p < 0,0001$), sodass hier zu Gunsten einer CABG auf eine PTCA verzichtet werden sollte (Mohr et al., 2013).

Eine Zusammenfassung der Indikationen zur CABG oder PTCA bei stabiler KHK (SCAD, stable coronary artery disease) kann folgender Tabelle entnommen werden:

Ausprägung der KHK	CABG Evidenzklasse	PTCA Evidenzklasse
1- oder 2-Gefäß-KHK ohne prox. RIVA-Stenose	IIb	I
1- oder 2-Gefäß-KHK mit prox. RIVA-Stenose	I	I
Hauptstammstenose, SYNTAX-Score ≤ 22	I	I
Hauptstammstenose, SYNTAX-Score 23-32	I	IIa
Hauptstammstenose, SYNTAX-Score > 32	I	III
3-Gefäß-KHK, SYNTAX-Score ≤ 22	I	I
3-Gefäß-KHK, SYNTAX-Score 23-32	I	III
3-Gefäß-KHK, SYNTAX-Score > 32	I	III

Tabelle 1: Indikation zur Revaskularisationstherapie bei SCAD nach Evidenzklasse

Evidenzklasse I = absolute Indikation; Evidenz aufgrund einer systematischen Übersichtsarbeit randomisierter/kontrollierter Studien (evtl. mit Metaanalyse) oder aufgrund mindestens einer hoch qualitativen randomisierten/kontrollierten Studie. **Evidenzklasse II = mögliche Option;** Evidenz aufgrund mindestens einer gut angelegten/kontrollierten Studie **ohne** Randomisierung oder aufgrund einer gut angelegten, quasi-experimentellen Studie. **Evidenzklasse III = keine Empfehlung;** Evidenz aufgrund gut angelegter/nicht experimenteller deskriptiver Studien. (nach Windecker et al. (2014). 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. Eur. Heart J. 35, 2541–2619.)

RIVA = Ramus interventricularis anterior; CABG = Bypass-Operation; PTCA = Perkutane transluminale Koronarangioplastie; KHK = Koronare Herzkrankheit.

Syntax-Score: Mit diesem Score können in 11 Schritten die anatomischen Gegebenheiten in den Koronararterien sowie klinische Faktoren (wie Alter, Geschlecht, Kreatinin Clearance) mit einbezogen werden um eine Langzeit-Vorhersage für schwere kardiale und zerebrovaskuläre Ereignisse wie Tod, MI, Apoplex und erneute Revaskularisation zu treffen (Sianos et al., 2005)(Farooq et al., 2013).

1.1.1 Ablauf der CABG

Prinzipiell gibt es verschiedene Varianten einer CABG. So erfolgt die klassische Bypass-Operation über eine mediane Thorakotomie, während minimal invasive Verfahren nur bei bestimmten Indikationen durchgeführt werden können. Es können hierbei sowohl arterielle oder venöse Grafts als Bypässe aufgenäht werden. Deren Präparation und Entnahme kann entweder endoskopisch oder offen erfolgen. Bei Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine (HLM) spricht man von einer sog. „on-pump“ CABG (ONCAB). Hierbei wird mittels kardioplegischer Lösung ein mechanischer Stillstand des Herzens erreicht, während der Körperkreislauf über die HLM erhalten wird. Alternativ kann eine Bypass-OP auch ohne extrakorporale Blutzirkulation im sog. „off-pump“ Verfahren (OPCAB) durchgeführt werden.

1.1.2 Transplantate zur CABG

Prinzipiell stehen für die CABG verschiedene Gefäße als Bypassgefäß zur Verfügung. Neben arteriellen Gefäßen wie der IMA (A. thoracica interna, internal mammary artery) und der Arteria radialis (RA, radial artery) werden ebenso venöse Gefäße, vor allem die VSM, verwendet. Die Entnahme der Gefäße erfolgt wie im Rahmen dieser Studie zumeist offen und wird in Kapitel 2.4 genauer beschrieben.

Während einer CABG werden in der Regel mehrere Bypässe, zumeist 2 oder 3 Bypässe (41% und 40%), gefolgt von 4 Bypässen (10%) aufgenäht (AQUA, 2015).

Aufgrund der Anzahl an Bypässen werden für eine CABG zumeist mehrere Transplantatgefäße benötigt. In Deutschland wurde die LIMA (left internal mammary artery) bei 93% aller CABG verwendet, gefolgt von der VSM (77%), der RIMA (22%, right internal mammary artery) und RA (9%) (AQUA, 2015). In Studien konnte eine statistisch signifikante Überlegenheit der IMA gegenüber venösen Transplantaten gezeigt werden. Vorallem bei 1-Gefäß-KHK des RIVA und bei Vorliegen einer 2- und 3-Gefäß-KHK ergaben sich signifikant höhere Überlebensraten nach 10 Jahren (Loop et al., 1986)(Boylan et al., 1994). Der LIMA-RIVA-Bypass gilt heute im Rahmen einer CABG als Goldstandard bei KHK der RIVA (Windecker et al., 2014). Ursächlich für diese Überlegenheit der IMA gegenüber anderen Gefäßen ist die verlangsamte Entwicklung von Atherosklerose. Diese wiederum wird durch besondere strukturelle Gegebenheiten der Endothelzellschicht, wie z.B. eine geringere interzelluläre Permeabilität, einen größeren Anteil an anti-thrombotischen Molekülen und eine gesteigerten eNOS-Produktion (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase) bedingt (Otsuka et al., 2013).

Neben arteriellen Bypässen können ebenfalls autologe venöse Gefäße zur CABG verwendet werden. Praktische Anwendung findet hierbei fast nur die VSM. In der Regel wird ein VSM-Bypass nur bei Mehrgefäß-KHK mit Bedarf für multiple Bypässe oder Ausschöpfung aller arterieller Transplantate eingesetzt. Dies erklärt sich durch die unterlegenen Kurz- als auch Langzeitergebnissen der VSM im Vergleich zur RA oder IMA (siehe Tabelle 2). So ist die Verschlussrate der VSM im Vergleich zur IMA zweifach erhöht (Gansera et al., 2007). In der weiteren Literatur zeigte sich ebenfalls eine deutliche Unterlegenheit der VSM gegenüber der RA (Cao et al., 2013). Bereits nach 5 Jahren zeigt sich bei 19,7% ein funktioneller Verschluss der VSM, während die RA lediglich in 12% eine Stenose aufweist (Deb et al., 2012). In der Prevent IV-Studie trat bei ca. 45% ein Transplantatversagen der VSM nach 12 bis 18 Monaten auf

(Alexander et al., 2005). Nach 15 Jahren beträgt die Offenheitsrate der VSM lediglich 50,7% und bildet somit den schlechtesten Wert im Vergleich zur LIMA, RIMA oder RA (Tatoulis et al., 2011). Ursächlich für die schlechten Kurz- und Langzeitergebnisse der VSM nach CABG sind die Veränderungen und Umbauprozesse, die mit dem Begriff „Vein Graft Disease“ bezeichnet werden (siehe Kapitel 1.2).

Obwohl die aktuelle Studienlage somit eine komplett arterielle Revaskularisation befürwortet, wurde in Deutschland im Jahr 2014 immer noch bei 76,6% aller implantierten Transplantate ein venöses Gefäß als Bypass verwendet (AQUA, 2015). Dies ist vor allem auf die langen Erfahrungswerte mit der VSM sowie deren einfache chirurgische Entnahme und Verfügbarkeit zurückzuführen.

In folgender Tabelle sind die Durchgängigkeit der verschiedenen Transplantate bis zu 15 Jahren nach CABG angegeben.

Transplantat	Durchgängigkeit [%]		
	1 Jahr	4-5 Jahre	≥10 Jahre
LIMA	>95%	90-95%	88-95%
RIMA	>95%	>90%	65-90%
RA	92-96%	90%	63-83%
VSM	75-95%	65-85%	32-71%

Tabelle 2: Durchgängigkeit [%] der verschiedenen Transplantate nach CABG. (nach Windecker et al. (2014). 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. Eur. Heart J. 35, 2541–2619.)

1.2 Vein Graft Disease

Unter der Vein Graft Disease (VGD) versteht man die pathophysiologischen Veränderungen der VSM, welche durch Benutzung einer VSM als Bypassgefäß auftreten. Hierdurch lässt sich das kurz- und langfristige Versagen des Transplantats, sowie die schlechtere Offenheitsrate der VSM erklären.

Nur wenige Jahre nach den ersten erfolgreichen CABG am Menschen war bereits absehbar, dass die VSM anfällig für ein Transplantatversagen war. So konnten Marti et al. bereits 1971 erstmals eine Thrombosierung sowie eine Verdickung der Tunica intima und Tunica media der VSM beschreiben (Marti et al., 1971). Im Verlauf der Jahre konnte durch den verbreiteten Einsatz der VSM vermehrt das Versagen des Bypass beobachtet werden. So kommt es bereits in bis zu 12% der Fälle direkt nach CABG zu einer akuten Thrombose, mit steigender Tendenz einer Stenose im Laufe der

Zeit (20-50% nach 5 Jahren) (Favaloro, 1998)(Motwani and Topol, 1998). Ursächlich hierfür ist die natürlich hohe Anpassungsfähigkeit venöser Gefäße an das ständig schwankende venöse Blutvolumen. So sind die vergleichsweise dünne Gefäßwand und die rasch einsetzenden Umbauprozesse prädisponierend für die VGD (Muto et al., 2010). Diese Anpassungsprozesse wurden in zahlreichen Studien untersucht und vereinfacht in drei Phasen unterteilt:

- Initiale Phase (= akute Thrombose)
- Intermediäre Phase (= Intima-Hyperplasie)
- Späte Phase (= Atherosklerose)

Prinzipiell verlaufen die Anpassungsprozesse der verschiedenen Phasen überlappend, sodass eine strikte Trennung nur aus didaktischen Gründen sinnvoll ist. Die initiale Phase bezeichnet den Zeitraum bis zum 30. post-operativen Tag und ist durch Ausbildung einer akuten Thrombose für einen frühzeitigen Verschluss des Bypass verantwortlich. Hieran schließt sich die intermediäre Phase an, welche sich bis zu einem Jahr nach CABG erstreckt. In dieser Phase steht die Hyperplasie der Tunica intima im Vordergrund. Im Anschluss folgt die späte Phase, die für ein spätes Transplantatversagen ursächlich ist und durch den Prozess der Atherosklerose gekennzeichnet ist (Kim et al., 2013).

Das Transplantatversagen ist definiert als kompletter Bypass-Verschluss, Stenose > 70% des Lumens oder als erhebliche Lumenverengung in der CA („String Sign“) (Harskamp et al., 2013).

Es existieren mehrere prädisponierende Faktoren für die VGD. Neben den klassischen Risikofaktoren der Artherosklerose gibt es eine Reihe weiterer Faktoren welche als fördernd für die VGD gelten. So konnten Roth et al. zeigen, dass nach einem Jahr Transplante mit einem größeren Lumendurchmesser deutlich höhere Offenheitsraten zeigten als schmälere Gefäße (Roth et al., 1979)(Cataldo et al., 1993). Das Zielgefäß spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle für die langfristige Durchgängigkeit des Bypass. Cataldo et al. konnten nachweisen, dass Bypässe auf den RIVA signifikant besser waren als vergleichsweise VSM-Interponate auf den RCX (Ramus circumflexus) oder die RCA (Cataldo et al., 1993). Der Stenosegrad der nativen Koronararterie hat ebenfalls einen Einfluss auf die Offenheitsrate (Roth et al., 1979). Bei lediglich gering stenosierter Koronarie besteht ein noch ausgeprägter kompetitiver Blutfluss, welcher den Fluss durch das Bypassgefäß verringert und hierdurch zur einem Bypassverschluss führen kann.

Weitere Studien konnten zudem zeigen, dass Frauen eine erhöhte perioperative Morbidität und Mortalität nach CABG aufweisen. Loop et al. konnten nach 2 Jahren einen signifikanten Unterschied in der Offenheitsrate der Bypässe gegenüber Männern feststellen (♀ 76,4% vs. ♂ 83,1%, $p < 0.001$) (Loop et al., 1983). Die Ursache dieser Verteilung wird in einem verhältnismäßig kleineren Durchmesser der Koronararterien vermutet (O'Connor et al., 1996). Das langfristige Überleben nach 5 Jahren, 10 Jahren (Loop et al., 1983) und 15 Jahren (Davis et al., 1995) war bei beiden Geschlechtern jedoch ohne signifikanten Unterschied. Als mögliche Ursache wird eine protektive Funktion des Östrogens angesehen (Sullivan et al., 1997).

Als weitere Risikofaktoren für die VGD werden in letzter Zeit Lipoprotein (a) (Lp(a)), Homocystein und Fibrinogen diskutiert (Motwani and Topol, 1998). Hoff et al. konnten zeigen, dass mit schrittweiser Erhöhung des Lp(a) die Prävalenz der Stenose venöser Bypässe entsprechend anstieg (Hoff et al., 1988). Homocystein gilt als isolierter Risikofaktoren für die Entwicklung einer KHK und wird somit auch als Risikofaktoren für die Entwicklung der VGD angesehen (Eritsland et al., 1994). Fibrinogen wiederum führt zu einer erhöhten Plasmaviskosität und zu einer gesteigerten Thrombozytenaggregation und fördert somit das frühe Bypassversagen (Meade, 1995)(Moor et al., 1994).

1.2.1 Akute Thrombose

Das frühe Transplantatversagen innerhalb des ersten Monats wird durch das Auftreten einer akuten Thrombose verursacht und kommt bei 3% bis 12% aller VSM-Bypässe vor (Motwani and Topol, 1998)(Manchio et al., 2005).

Die zugrunde liegenden Mechanismen für die Ausbildung einer Thrombose sind entsprechend der Virchow-Trias eine Veränderung der Gefäßwand, eine veränderte Strömungsgeschwindigkeit sowie eine veränderte Blutviskosität (Bagot and Arya, 2008). Den hauptverantwortlichen Mechanismus für ein frühes Transplantatversagen stellt die Endothelverletzung dar (Manchio et al., 2005). Endothelzellen spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der kardiovaskulären Homöostase. Sie sind entscheidend für die Membranpermeabilität, den Lipidtransport, die Vasomotorik über die eNOS und inflammatorische Prozesse (Verrier and Boyle, 1996). Zudem regulieren sie koagulatorische und fibrinolytische Prozesse (Thatte and Khuri, 2001). Die intraoperative Präparation der VSM (z.B. Dehnung durch Spülen, Schneiden und Annähen als Bypass) kann somit durch eine Schädigung des Endothels den Ausgangspunkt der VGD darstellen (Roubos et al., 1995).

Zu Beginn der VGD kommt es durch die Präparation und Entnahme der VSM zu einer Unterbindung der Blutversorgung über die Vasa vasorum und folglich zu einer Hypoxie der Gefäßwand (Harskamp et al., 2013). Diese Hypoxie führt zu einer Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen (z.B. Interleukin IL-6 und IL-8) mit Funktionsverlust des Endothels. Durch mechanische Irritationen während der Präparation kommt es in der Folge zu einem weiteren Endothelschaden (Thatte and Khuri, 2001). Hierauf folgt die Adhäsion von Thrombozyten über das Adhäsionsmolekül CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1) an die Gefäßwand und in der Folge die Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten (Epstein and Ross, 1999). Sie schütten nun selbst pro-inflammatorische Zytokine und Proteasen aus, welche die Endotheldysfunktion weiter verstärken. Parallel zur Thrombozytenadhäsion binden Leukozyten an Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen. Hierbei spielen besonders Adhäsionsmoleküle der Selektine (z.B. P-Selektin) und Immunglobuline der Superfamilie wie z.B. intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) und vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) eine tragende Rolle (Huo and Ley, 2001)(Crook et al., 2008)(Jang et al., 1994).

Weiterhin erfolgt nach Schädigung der einzelligen Endothelzellschicht eine Freilegung des Thromboplastins (auch: Tissue factor, Faktor III) in der subendothelialen Gewebematrix und hierüber eine Aktivierung des extrinsischen Weges der Gerinnungskaskade (Verrier and Boyle, 1996). Durch die Endothelverletzung kommt es zu einer Reduktion des gewebespezifischen Plasminogenaktivators (auch: tissue plasminogen activator, t-PA), welcher normalerweise über Aktivierung des Plasmins eine fibrinolytische Wirkung entfaltet (Nachman and Silverstein, 1993). Eine weitere prothrombotische Wirkung wird über eine bis zu 30% verringerte Thrombomodulin-Aktivität im Bereich des Endothelschadens ausgelöst (Cook et al., 1991). Dieses aktiviert normalerweise das Protein C und führt hierüber zu einem antikoagulatorischen Effekt. Weiterhin begünstigend wirkt sich die hohe Sensitivität der Gefäßwand im Bereich der Endothelverletzung für die vasokonstriktive Substanz Endothelin-1, Thromboxan A₂ (TXA₂) und Angiotensin II aus (Verrier and Boyle, 1996)(Thatte and Khuri, 2001)(Sellke et al., 1997)(Verrier and Boyle, 1996).

Ein weiterer Thrombose-begünstigender Faktor venöser Gefäß im Vergleich zu Arterien ist der geringe Gehalt von Heparinsulfat in der Tunica media und die dünne Tunica elastica interna (Motwani and Topol, 1998). Heparin führt normalerweise zu einer Potenzierung der antithrombotischen Wirkung von Antithrombin III (AT III). Ebenso findet sich in Venen im Vergleich zu Arterien eine geringere Produktion von NO und Prostazyklin (PGI₂), welche beide als Hemmer der Thrombozytenaktivierung

wirken (Thatte and Khuri, 2001). Durch Gefäßirritationen bei der VSM-Entnahme kommt es über die Endothelschädigung zu einer weiteren Reduktion der eNOS (Dashwood et al., 2005)(Thatte and Khuri, 2001) und somit eine weiter verstärkten Thrombozytenaggregation.

Die aktivierten Thrombozyten sezernieren vasoaktive Substanzen wie Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), Serotonin (5-HT), TXA₂ und Plättchenaktivierenden Faktor (PAF), welche vaskokonstriktiv wirken und über eine weitere Rekrutierung und Aktivierung von Thrombozyten einen raschen Progress der VGD bewirken (Thatte and Khuri, 2001).

Ebenso begünstigend für eine frühe Thrombose sind Venenklappen welche im arteriellen Blutstrom zu Turbulenzen führen und somit ebenfalls zu einer Schädigung des Endothels führen können (Lajos et al., 2007)(Muto et al., 2010). Durch den arteriellen Blutfluss im Bypass kommt es zu einer Dehnung der VSM und folglich zu einem Abfall der mittleren Fließgeschwindigkeit des Blutes mit Reduktion der Scherkräfte. Dieser Abfall der Scherkräfte bewirkt schließlich eine reduzierte Freisetzung der antithrombotischen Substanzen t-PA, NO und PGI₂ (Motwani and Topol, 1998).

1.2.2 Intima Hyperplasie

Unter Intima Hyperplasie versteht man die Akkumulation glatter Gefäßmuskulatur (VSMC, vascular smooth muscle cells) und Extrazellulärmatrix in der Tunica intima eines Gefäßes (Motwani and Topol, 1998). Dieser Prozess, der bereits nach 4 bis 6 Wochen bei fast allen venösen Bypassen zu einer Verdickung der Intima mit beginnender Stenosierung des Lumens um bis zu 25% führt, ist ein weiterer Grundstein der VGD (Motwani and Topol, 1998).

Nach Mitra et al. wird die Ausbildung der Neointima in 5 Stadien eingeteilt: Thrombozytenaktivierung, Inflammation, Aktivierung der Gerinnungskaskade, VSMC-Migration und schließlich VSMC-Proliferation (Mitra et al., 2006). Die wichtigste Rolle spielen jedoch die VSMC, welche durch Wachstumsfaktoren und Zytokine aktiviert werden und dadurch aus der Tunica media in die Intima wandern. Auf ihrem Weg durchlaufen die VSMC eine phänotypische Differenzierung von kontraktilen zu synthetisierenden Muskelzellen (George and Johnson, 2010). In der Intima angekommen, proliferieren die VSMC und beginnen extrazelluläre Matrix zu

synthetisieren, sodass es zu einer Hyperplasie der Intima mit nachfolgender Lumeneinengung kommt.

Während der ischämischen Phase durch Unterbindung der Blutversorgung der VSM über die Vasa vasorum bei operativer Entnahme wird die endotheliale Produktion antiproliferativer Mediatoren wie PGI_2 und Adenosin gedrosselt. Durch die Intima Hyperplasie steigt der Sauerstoffbedarf jedoch zusätzlich (Shukla and Jeremy, 2012). Als Folge dieser Hypoxie entstehen vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS, Superoxid-Radikale), welche direkt und indirekt über den Abbau von freigesetztem NO die Proliferation und Migration von VSMC begünstigen (Rao and Berk, 1992)(Thatte and Khuri, 2001)(Jeremy et al., 2002)(Muzaffar, 2005). Die hemmende Wirkung von NO auf die Ausbildung einer Neointima durch Hemmung der VSMC-Proliferation und -Migration konnte in einem Tiermodell von Ohta und Kollegen gezeigt werden (Ohta et al., 2002).

Eine gesteigerte pulsatile Wandspannung unter arteriellem Blutfluss (arteriell 100 mmHg vs. venös 10 mmHg) führt zu Apoptose und folgender Zellproliferation (Harskamp et al., 2013)(Liu et al., 2002). Zudem werden intimale Rezeptoren für basic fibroblast growth factor (bFGF), einem potenten Mitogen für VSMC, hochreguliert (Nguyen et al., 1994). Da sich Scherstress direkt proportional zum Blutfluss und indirekt proportional zum Gefäßdurchmesser verhält, führt die Dehnung der VSM als Bypass zu einem verlangsamten Blutfluss und somit zur Reduktion der Scherkräfte (Thatte and Khuri, 2001). Dies wiederum fördert die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, während Wachstumsinhibitoren wie NO reduziert werden (Allaire and Clowes, 1997) (Cox et al., 1991)(Thatte and Khuri, 2001).

Als Folge all dieser Veränderungen kommt es zu einer ausgeprägten Proliferation glatter Muskelzellen in der Intima und mittelfristig zu einem fibromuskulären Verschluss des Gefäßes.

1.2.3 Atherosklerose

Im Anschluss an die Intima Hyperplasie nach dem ersten postoperativen Jahr folgt der Prozess der Atherosklerose. Prinzipiell entspricht der Prozess der Atherosklerose in venösen Gefäßen dem in Arterien (Parang and Arora, 2009)(Davies and Hagen, 1995).

Als Folge der chronischen Endothelverletzung und chronischen Entzündungsreaktion mit gesenkter NO-Produktion steigt die Gefäßpermeabilität und es kommt zu einer

Extravasation und Migration von Monozyten über die geweitete Endothelschranke in die Tunica intima (Libby, 2004). Zusätzlich gelangen auch LDL-Partikel (Low Density Lipoprotein) durch die Endothelschranke in die Intima, wo sie durch reaktive ROS oxidiert und durch Makrophagen phagozytiert werden (Steinberg, 2008) (Navab, 2004). Nach Aufnahme des oxidierten LDLs sind histologisch zytoplasmatische Fetttropfen in den Makrophagen zu erkennen, sodass man nun von Schaumzellen spricht (Libby, 2002). Makroskopisch erscheinen diese Schaumzellen als subendotheliale Fettablagerungen, welche als Fatty Streaks bezeichnet werden. Die von den VSMC synthetisierte Extrazellulärmatrix legt sich über die Schaumzellen und bildet einen atherosklerotischen Plaque, welcher aus einem Lipidkern (Schaumzellen) und einer darüber gelegenen Deckplatte (Extrazellulärmatrix) besteht. Kommt es in Folge der Entzündungsprozesse zu einer Plaqueruptur, wird die Aggregation von Thrombozyten getriggert und es kommt zu einem thrombotischen Gefäßverschluss.

Aufgrund der chronischen Endothelbeschädigung und -dysfunktion in venösen Bypässen schreitet die Atherosklerose hier deutlich schneller voran (Verrier and Boyle, 1996)(Motwani and Topol, 1998). So konnten bereits ein Jahr nach CABG atheromatöse Plaques nachgewiesen werden (Lie et al., 1977) (Kalan and Roberts, 1990).

Eine in vivo Studie konnte zeigen, dass eine kompensatorische Erweiterung und somit Verzögerung einer klinisch relevanten Stenosierung, wie sie in arteriellen Gefäßen im Rahmen der Atherosklerose auftritt, in der VSM ausbleibt (Glagov et al., 1987) (Nishioka et al., 1996). Zudem zeigt sich in venösen Transplantaten ein proatherosklerotischer Fettumsatz mit verzögerter Lipolyse, gesteigerter Lipidsynthese und -aufnahme im Vergleich zu arteriellen Gefäßen (Motwani and Topol, 1998).

1.2.4 Prävention der VGD

Die Prävention und Therapie der VGD nach CABG kann medikamentös erfolgen. Für die Einnahme von Acetylsalicylsäure (ASS) und von Statinen gibt es zwei Klasse I Empfehlungen (Eagle, 2004).

Die Senkung des LDL-Cholesterins auf Werte <100 mg/dL mittels Lovastatin zeigt eine deutlich geringere Progression der Atherosklerose im Vergleich zu Patienten mit nur mäßiger Senkung des LDL-Cholesterin-Wertes (The Post Coronary Artery Bypass

Graft Trial Investigators, 1997). Eine Follow-Up Studie nach 3 Jahren konnte die Verlangsamung der Atherosklerose bestätigen (Knatterud et al., 2000).

Die Einnahme von ASS führt zu einer verbesserten Offenheitsraten für die VSM nach einem Jahr (Goldman et al., 1989). Gavaghan et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass bereits durch die Einnahme von ASS eine Stunde nach CABG eine deutliche geringere Stenoserate nach einer Woche, bzw. nach einem Jahr erreicht werden kann (Gavaghan et al., 1991). Ein prä-operativer Beginn einer ASS-Therapie ergab jedoch keinen zusätzlichen Benefit und war mit einer erhöhten Blutungsgefahr assoziiert (Goldman et al., 1991). Ebenso ohne zusätzlichen Nutzen für die VSM-Offenheitsrate blieb die langfristige Einnahme von ASS über das erste post-operative Jahr hinaus (Goldman et al., 1994).

Im Gegensatz zur PTCA besteht nach CABG keine prinzipielle Indikation zur dualen Antikoagulation mit Clopidogrel und ASS. In der CASCADE-Studie aus dem Jahr 2010 konnte durch die zusätzliche Gabe von Clopidogrel keine signifikante Reduktion der Intima-Hyperplasie nach einem Jahr erreicht werden (Kulik et al., 2010). Kürzlich zeigten jedoch Deo et al., dass mittels dualer Plättchenhemmung eine Reduktion des frühen Transplantatversagens (akute Thrombose) und somit eine geringere 30-Tages-Mortalität erreicht werden kann, bei jedoch gesteigertem Blutungsrisiko (Deo et al., 2013).

Präventiv wirken auch verbesserte Methoden zur Präparation und Entnahme der VSM. So konnte die „no-touch“-Technik eine Minimalisierung des Endothelschadens (Dashwood et al., 2009)(Dashwood and Tsui, 2013) und hierdurch verbesserte kurz- und langfristige Offenheitsraten ähnlich denen der IMA zeigen (Souza et al., 2001) (Souza et al., 2006). Ein direkter Vergleich der offenen Entnahme und der „no-touch“-Technik ergab eine signifikante Überlegenheit der VSM mit perivaskulärem Gewebe nach 18 Monaten (Souza et al., 2002). Dies ist vorallem auf das perivaskuläre Bindegewebe zurückzuführen, welches zum einen die Vasa vasorum enthält und zum anderen auf den Erhalt der eNOS, welche Vasospasmen vorbeugt und durch gesteigerte NO-Sekretion antiproliferativ und antithrombotisch wirkt (Tsui et al., 2002)(Dreifaldt et al., 2011).

Zu den neuen Möglichkeiten der VGD-Therapie, die in ersten Studien vielversprechende Ergebnisse lieferten, gehört der Einsatz von externen Stents um die VSM (Mehta et al., 1998)(Desai et al., 2010) sowie die Gen-Therapie zur Unterdrückung spezieller Mediatoren in der VGD-Kaskade (Robertson et al., 2012)

(Southerland et al., 2013)(Wang et al., 2013). Diese Therapieoptionen konnten sich bisher jedoch noch nicht in der klinischen Praxis durchsetzen.

1.3 Zusammenfassung und Zielsetzung

Aufgrund der bisher unklaren Studienergebnisse soll der Einfluss des Spüldrucks während der Präparation der VSM auf deren Bypassqualität untersucht werden. Hierfür wurden die Patienten vor einer Bypass-Operation mit geplanter Venenentnahme randomisiert. In der einen Gruppe erfolgte die Entnahme der Vene unter Benutzung der drucklimitierenden VASOSHIELD-Spritze, bei der anderen Gruppe wurde eine konventionelle Spritze verwendet.

Aufgrund der bisherigen Studienlage und des Versuchsaufbaus ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Zeigen sich Unterschiede in der **Endothelintegrität** beim Vergleich der zwei Entnahmemethoden?
2. Zeigt sich eine unterschiedliche Expression der **endothelialen NO-Synthase** (eNOS) als Folge der verschiedenen Spüldrücke?
3. Zeigen sich unterschiedliche Expressionen der zellulären Adhäsionsmoleküle (CAM, cell adhesion molecule) **Intercellular Adhesion Molecule** (ICAM-1), **Vascular Cell Adhesion Molecule** (VCAM-1) und **P-Selectin** als Folge des Spüldrucks?
4. Kann durch die Verwendung der VASOSHIELD-Spritze eine Schädigung der VSM reduziert und hierdurch das Risiko eines Bypassverschlusses vermindert werden.

2 METHODEN

2.1 Versuchsbeschreibung

Es handelt sich hierbei um eine prospektive randomisierte verblindete Studie. Dem Vorhaben dieser Arbeit wurde im Rahmen des Arzneimittel-, Medizinprodukt- und hessischen Datenschutzgesetzes von der zuständigen Ethik-Kommission bei der Landesärztekammer in Hessen vor Beginn der Studie zugestimmt (Aktenzeichen: FF 92/2011).

Ziel dieser Arbeit war es die Qualität der VSM nach Entnahme mittels druckkontrollierter VASOSHIELD-Spritze und der Entnahme durch eine herkömmliche Spritze im Rahmen einer CABG zu vergleichen. Entsprechend der Prozesse der VGD und der aktuellen Literatur wurde hierfür geeignete Marker zur Objektivierung der Schädigung der VSM ausgewählt. So wurde die Endothelintegrität mithilfe des Markers CD31, welcher auf Endothelzellen exprimiert wird, untersucht. Eine entscheidende Rolle in der kardiovaskulären Homöostase spielt NO. Zur Beurteilung möglicher Veränderungen von NO erfolgte die Messung von eNOS. Als Adhäsionsmoleküle, welche im Rahmen der VGD hochreguliert werden, wurden ICAM-1, VCAM-1 und P-Selectin ausgewählt. Die Messung der Targets erfolgte histologisch und molekularbiologisch (siehe Kapitel 2.6 und 2.7).

Die Patienten wurden präoperativ über die Studie aufgeklärt und nach schriftlicher Zustimmung randomisiert. Es wurden insgesamt 83 Patienten eingeschlossen und in zwei Gruppen eingeteilt (siehe Kapitel 2.2).

Der Maximaldruck der VASOSHIELD-Spritze wurde auf 250 mmHg eingestellt. Die am Ende der CABG anfallenden Venenreste wurden direkt im Anschluss der Operation ins Labor gebracht und weiter verarbeitet.

2.2 Patientenkollektiv

In die Studie wurden Venen von insgesamt 83 Patienten (♂: n = 63, ♀: n = 20) eingeschlossen. Diese Patienten wurden je nach Entnahmemethode der VSM in Gruppe 1 (Entnahme mit der VASOSHIELD-Spitze) oder Gruppe 2 (Entnahme mit konventioneller Spritze) eingeteilt. So waren nach Abschluss der Probensammlung 40 Proben in Gruppe 1 und 43 Proben in Gruppe 2.

Die Verteilung der Geschlechter und das mittlere Alter innerhalb jeder Gruppe sind in folgender Tabelle dargestellt.

	Gruppe 1 (VASOSHIELD)		Gruppe 2 (Konventionell)		Gesamt (Gruppe 1 + 2)
Geschlecht	♂	♀	♂	♀	
Anzahl (n)	32	8	31	12	83
Alter in Jahren (MW ± SEM)	73,03 ± 7,06	77,50 ± 6,52	71,77 ± 8,30	76,50 ± 7,68	
Alter in Jahren (MW ± SEM)	73,95 ± 7,18		73,09 ± 6,44		73,5 ± 8,3

Tabelle 3: Probenverteilung auf die Untersuchungsgruppen.
Abkürzungen: MW = Mittelwert, SEM = Standardfehler

Bezüglich klinischer Daten wie kardiovaskulären Risikofaktoren entsprach das Patientengut den typischen KHK-Patienten. Zum Ausschluss aus der Studie führten neben klinikinternen Ausschlusskriterien (z.B. Gerinnungsproblematik, Komorbiditäten mit hohem Risiko intraoperativer Komplikationen) eine bekannte periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) sowie eine chronisch venöse Insuffizienz mit Varikosis.

2.3 VASOSHIELD – Spritze mit Druckkontrolle

Die VSM der Patienten aus Gruppe 1 wurden mit der VASOSHIELD-Spritze präpariert. Die Spritze wurde zur schonenden Gefäßpräparation im Jahr 2010 von der Firma Maquet auf den Markt gebracht und unterscheidet sich im Wesentlichen von herkömmlichen Spritzen durch die Möglichkeit der Limitation des Spüldrucks. Dies geschieht über ein Druckablassventil, welches über einen Einstellungsring am Ende des Kolbens auf drei verschiedene Werte eingestellt werden kann. Hierdurch ist eine Begrenzung des maximalen Spüldrucks auf 150 mmHg, 250 mmHg oder 350 mmHg möglich (siehe Abbildung 1).

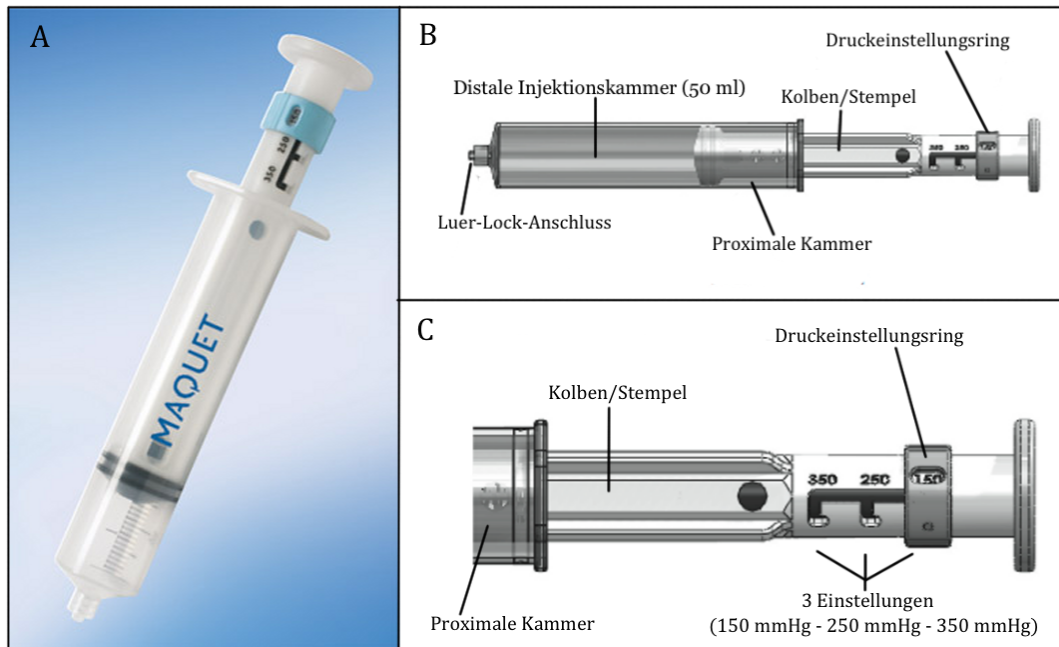


Abbildung 1: VASOSHIELD-Spritze mit Druckkontrolle.

A: Foto der einsatzfähigen VASOSHIELD-Spritze. **B:** Schematischer Aufbau der gesamten VASOSHIELD-Spritze. **C:** Schematischer Aufbau der Druckeinstellung (150 – 250 – 350 mmHg) am Kolben der VASOSHIELD-Spritze. (alle Bilder © Maquet AG, Rastatt, D)

Das Prinzip der Spritze beruht auf der Spannung einer Feder, welche dem Spüldruck entgegenwirkt. Bei Überschreiten des eingestellten Maximaldrucks wird über die Feder ein Druckablassventil geöffnet und ein Teil der Flüssigkeitsmenge aus der Injektionskammer fließt in die proximale Kammer. Der genaue Mechanismus der Druckeinstellung und des Druckablassventils wird in Abbildung 2 schematisch dargestellt und erläutert.

Bei der VASOSHIELD-Spritze handelt es sich um ein Produkt, das steril verpackt geliefert wird und für den einmaligen Gebrauch gedacht ist. Vor Verwendung sollte einmalig die korrekte Funktionsweise der Spritze überprüft werden. Im Gegensatz zu herkömmlichen für die Präparation der VSM verwendeten 10 ml großen Spritzen (z.B. Omnifix® Solo, B. Braun AG, Melsungen, D) ist die VASOSHIELD-Spritze mit einem Volumen von 50 ml deutlich größer. Hierdurch kann ein möglicher Flüssigkeitsverlust über das Druckablassventil problemlos kompensiert werden. Die im Rahmen dieser Studie verwendeten VASOSHIELD-Spritzen wurden kostenfrei von der Firma Maquet AG (Rastatt, D) zur Verfügung gestellt. Eine weitere Finanzierung dieser Arbeit fand nicht statt, sodass kein Interessenkonflikt während der Durchführung und Auswertung bestand.

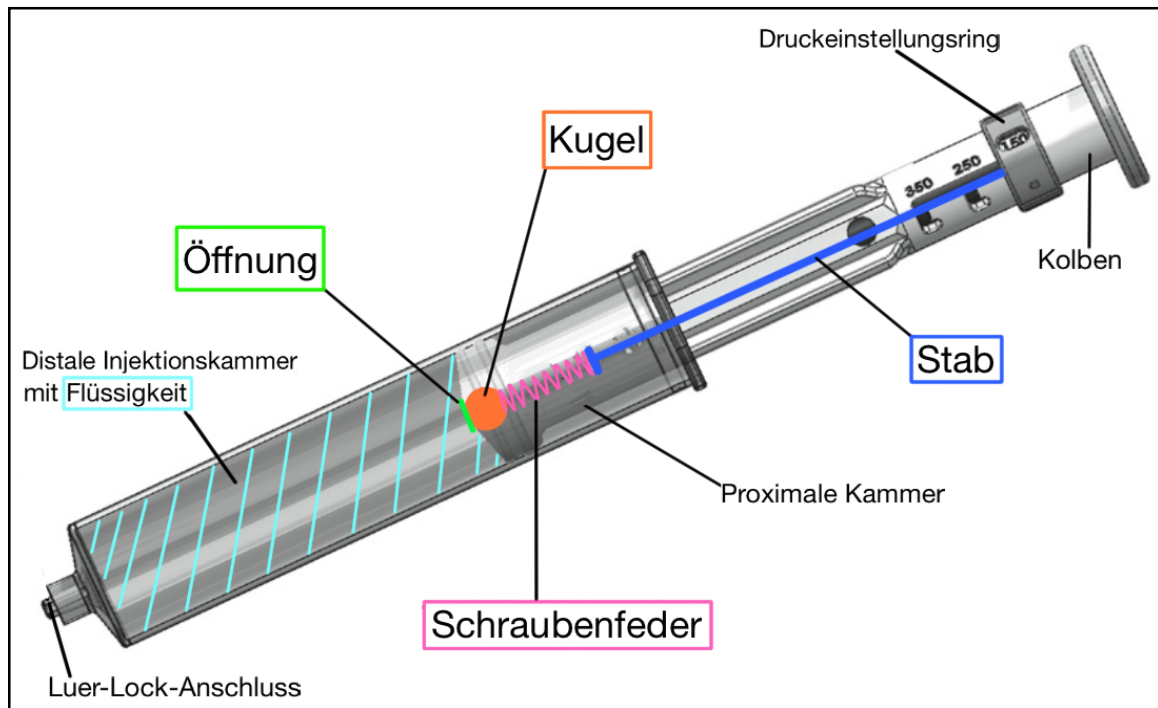


Abbildung 2: Schema des Mechanismus der Druckeinstellung inkl. Ablassventil.

Im Bild sind die Funktionen der Druckeinstellung und des Druckablassventils dargestellt. Über den Druckeinstellungsring wird über einen Stab eine Schraubenfeder ge- oder entspannt. Je höher der eingestellte Druck, desto stärker wird der Stab im Inneren des Kolbens nach unten gedrückt und hierdurch eine stärkere Komprimierung der Schraubenfeder erreicht. Die Schraubenfeder wiederum gibt ihre Spannung auf eine Kugel weiter, welche eine Öffnung am Ende des Kolbens verschließt. Wird nun bei Verwendung der Spritze ein Druck aufgebaut, der die Spannung der Feder übertrifft, so wird die Kugel samt Feder ins Kolbeninnere gedrückt und die Öffnung freigegeben. Flüssigkeit kann nun über die Öffnung in die proximale Kammer fließen und der Spüldruck somit konstant gehalten werden.

Der Hersteller garantiert für eine maximale Abweichung von $\pm 15\%$ des eingestellten Drucks. (Bild © Maquet AG, Rastatt, D)

2.4 Vorgehen bei der Operation

Nach Einleitung der Narkose und Anschluss aller intra-operativen Monitoringverfahren (wie z.B. EKG, intravasale Blutdruckmessung, zentraler Venenkatheter, Beatmungsgerät inklusive Kapnometrie) durch den Anästhesisten erfolgte die Schaffung steriler Verhältnisse des Operationsgebiets nach Hausstandard. Parallel zur Eröffnung des Thorax durch mediane Sternotomie und Präparation der LIMA erfolgte die Entnahme der VSM am Bein. Hierzu führte der Operateur eine Inzision ca. 2-3 cm oberhalb des medialen Malleolus durch. Anschließend erfolgte das Aufsuchen und die Darstellung der VSM mittels stumpfer Präparation mit einer Schere. Im weiteren Verlauf wurde die Inzision der Haut entlang des Verlaufs der VSM nach proximal erweitert. Durch Präparation wurde die Vene über die gesamte benötigte Länge

freigelegt, vom umliegenden Bindegewebe gelöst und alle Gefäßäste dargestellt. Nun wurde die Vene distal am Malleolus medialis abgeklemmt und über eine kurze Gefäßinzision eine Knopfkanüle eingeführt und per Ligatur fixiert. Durch diese Kanüle wurde die Venen nun mehrmals mit heparinisiertem Blut (mit NaCl verdünnt) gespült um die Gefäßabgänge besser darzustellen und die Dichtigkeit des Grafts zu kontrollieren. Mithilfe von Faden-Ligaturen und nicht ferromagnetischen Gefäßclips wurden die Seitenäste proximal und distal der VSM verschlossen und anschließend dazwischen durchtrennt. Es wurde darauf geachtet die Ligatur und die Clips nahe an der VSM zu setzen um keine langen Gefäßstümpfe der Seitenäste zu belassen, da diese die Gefahr der Thrombosierung und somit eine Gefährdung der Bypassqualität darstellen.

Undichte Stellen wurden nochmals ligiert, geclippt oder mittels Naht umstochen. Nach Sicherstellung der Dichtigkeit des Gefäßes und Präparation einer ausreichenden Länge wurde die VSM proximal und distal abgesetzt. Anschließend erfolgte die Aufbewahrung des Transplantats in heparinisiertem Blut bis zur Anastomosierung am Herzen. Nach Entnahme der Vene wurden die proximalen und distalen Venenstümpfe am Bein nochmals überprüft und der Wundverschluss unter Einlage einer Redondrainage durchgeführt.

Vor Anastomosierung wurde die VSM nochmals mit Hilfe der Blut-Heparin-NaCl-Lösung gespült und gebläht um auf mögliche Lecks zu untersuchen. Nach Herstellung der distalen Anastomose wurde die VSM erneut gespült, um die Dichtigkeit der Anastomose zu überprüfen. Danach wurde der Bypass durch eine zentrale Anastomose (z.B. in die Aorta) vervollständigt. Der verbliebene Rest der entnommenen VSM wurde in einem verschließbaren Gefäß in einer Blut-Heparin- oder NaCl-Lösung bis zum Abschluss der Operation gelagert und anschließend sofort ins Labor zur weiteren Verarbeitung gebracht.

Die Spülvorgänge der VSM mit der VASOSHIELD-Spritze wurden mit einem Maximaldruck von 250 mmHg durchgeführt. Die Überlegung hierbei war ein ausreichendes Spülen und Aufblähen der VSM gewährleisten zu können und gleichzeitig einer übermäßigen Schädigung des Gefäßes vorzubeugen. Bei der Einstellung mit 150 mmHg würde das Gefäß beim Spülvorgang zwar bestmöglich geschützt, jedoch war bei diesem Druck die Präparation der VSM deutlich erschwert.

2.5 Postoperative Probenverarbeitung

Direkt nach Operationsende wurde der standardmäßig anfallende Venenrest im Labor untersucht. Bei Raumtemperatur (RT) und unter einem Abzug erfolgte dort die sofortige Entnahme der Probe aus der Blut-Heparin- (n = 73) oder NaCl-Lösung (n = 10) in eine Petrischale mit steriler und pH-neutraler phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS). Dort wurde die Probe auf ihre äußere Beschaffenheit begutachtet und kurz dokumentiert.

Im ersten Schritt wurden eine mögliche Kanüle sowie Ligaturen und Ligatur-Clips möglichst schonend entfernt. Das Gefäß wurde anschließend mittels eines Skalpells in mehrere ca. 5 mm lange Stückchen geschnitten. Zur Probensicherung für die späteren molekularbiologischen Untersuchungen wurden 1-2 Stückchen Vene nochmals in ca. 1 mm dünne Scheiben geschnitten und im Anschluss sofort in ein steriles und vorgekühltes Cryo.sTM-Röhrchen gegeben. Dieses wurde in flüssigem Stickstoff (Temperatur < -195°C) sofort gefroren und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die restlichen Venenstücke wurden unter Schonung des Gewebes vorsichtig in ein mit einem Einbettmedium (Tissue-Tek[®] O.C.T.) gefülltes Cryomold[®]-Einbettschälchen gestellt und ebenfalls sofort mit flüssigem Stickstoff fixiert. Auch hier erfolgte eine Lagerung der Proben bis zur histologischen Verarbeitung bei -80°C. Mögliche Probenreste wurden unter Einhaltung der laborinternen Richtlinien für potentiell infektiöses Material verworfen.

In der folgenden Abbildung werden die einzelnen Schritte der Probenverarbeitung im Labor veranschaulicht:

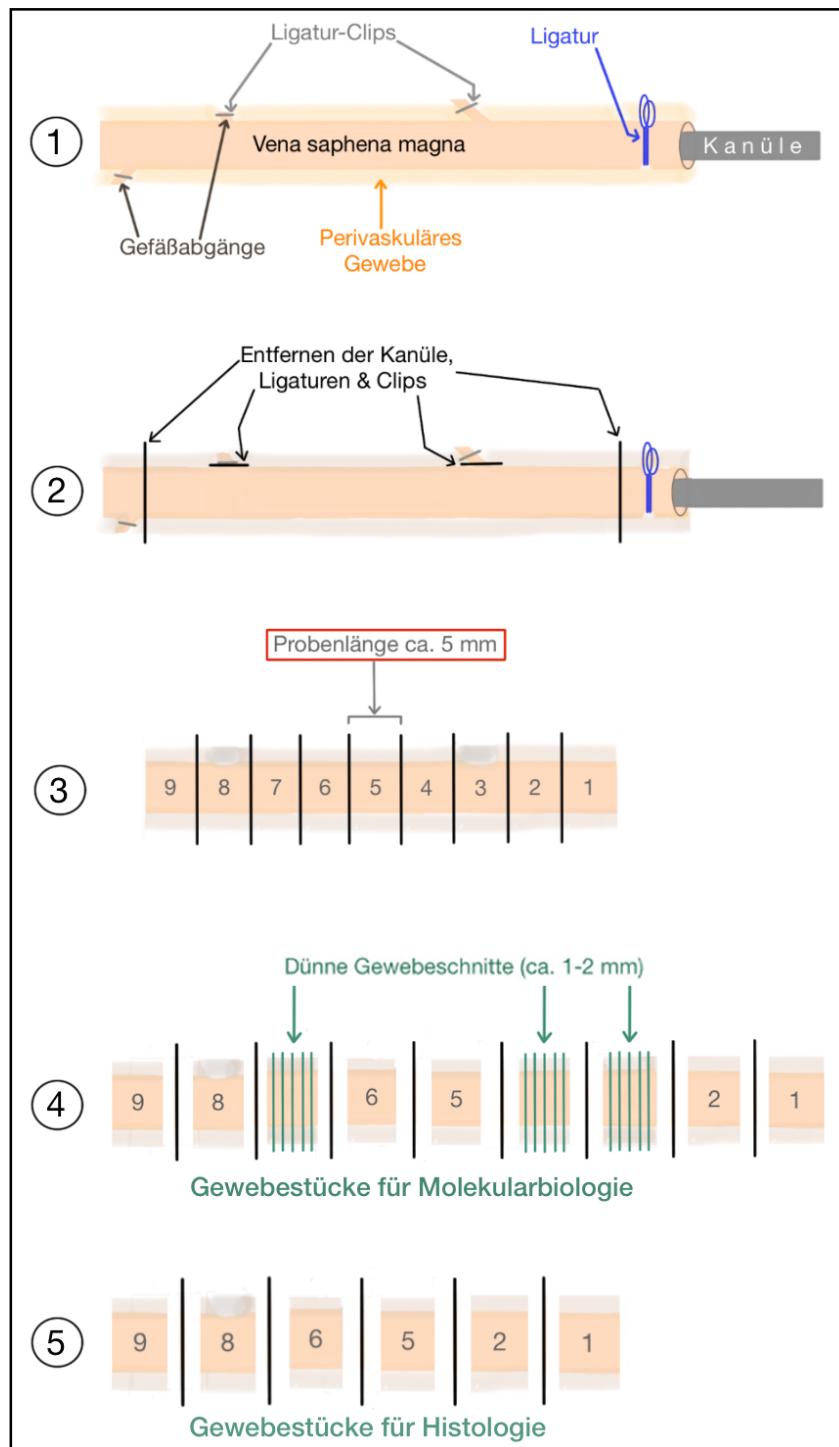


Abbildung 3: Schema der Venen-Präparation nach operativer Entnahme.

1. Schema der VSM bei Eintreffen im Labor. Die Länge der Venen, als auch die Anzahl der Clips, Ligaturen und Gefäßabgänge waren unterschiedlich. Eine Kanüle war nicht bei allen Venen vorhanden. 2. Es wurden alle Fremdkörper (Kanüle, Ligatur, Clip) mit einem Skalpell möglichst schonend abgetrennt. 3. Die Venen wurden in mehrere ca. 5 mm lange Stückchen geschnitten. 4. 1-2 Stücke pro Probe wurden in ca. 1 mm dünne Scheiben geschnitten und für die molekularebiologische Untersuchung in flüssigem Stickstoff fixiert. 5. Alle restlichen Schnitte wurden in einem Einbettmedium und flüssigem Stickstoff bis zur histologischen Verarbeitung fixiert.

2.6 Histologie und Immunhistochemie

2.6.1 Herstellung beschichteter Objektträger

Um ein Ablösen der Schnitte während der verschiedenen Wasch-, Färb- und Inkubationsschritte zu vermeiden, wurden alle Objektträger mit einer Silane-Beschichtung versehen.

Nach mehrmaligem Waschen in 100%-igem vergälltem Ethanol und destilliertem Wasser wurden die Objektträger 10 Minuten (min) in einer mit Aceton auf 2% verdünnten Silane (3'-Aminopropyl-Triethoxy-Silane)-Lösung getaucht. Anschließend wurden die Objektträger 10 min in reinem Aceton belassen und dann zweimal jeweils für 5 min in destilliertem H₂O gewaschen. Es folgte das Trocknen der Objektträger bei 37 – 38 °C im Brutschrank über Nacht.

2.6.2 Anfertigung der Gefrierschnitte

Die in Tissue-Tek und bei -80°C gelagerten ca. 5 mm langen Venenstücke wurden mittels Tissue-Tek auf Aluminiumblöcken befestigt und mit einem Gefriermikrotom bei - 20 °C in 6 µm dicke Scheiben geschnitten. Diese Schnitte wurden anschließend möglichst ohne weitere Manipulation mit den Silane-beschichteten Objektträgern aufgenommen und 10 min bei Raumluft und -temperatur getrocknet. Anschließend folgte die Fixierung der Schnitte für 10 min in eiskaltem Aceton (- 20 °C) bevor die weiteren Färbeschritte durchgeführt wurden.

2.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Von jeder Patientenprobe wurden vor allen weiteren Schritten mehrere Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) angefertigt. Hierbei wurde das Augenmerk auf die Probenbeschaffenheit und -qualität gelegt, um einen ersten Eindruck der Gefäße zu erhalten und die passenden Venenstücke für die weiteren Untersuchungen auszuwählen.

Die HE-Färbungen wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

Schritt	Substanz	Dauer
1 Kernfärbung	Hämalaun	10 min
2 Waschen	Aquq dest.	5 min
3 Bläuen	Lauwarmes fließendes H ₂ O	Mehrmaliges Eintauchen
4 Färbung	Eosin (0,5%)	5 min
5 Entwässern	Aufsteigende Alkoholreihe (95%, 100%, 100%)	Mehrmaliges Eintauchen
6 Klären	Xylol	Mehrmaliges Eintauchen
7 Eindeckeln	Entellan®	-

Tabelle 4: Färbeprotokoll für die Hämaltoxylin-Eosin-Färbung

2.6.4 Immunhistochemie

Unter Immunhistochemie (IHC) versteht man das Sichtbarmachen spezifischer Zielstrukturen mithilfe von mono- oder polyklonalen Antikörpern, welche spezifisch an ihr Antigen binden und dadurch Antigen-Antikörper-Komplexe bilden. Diese Komplexe können durch Farbstoffe oder einer anschließenden Enzymreaktion sichtbar gemacht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Immunfluoreszenzhistochemie die 2-Schritt-Methode angewendet, in welcher der Sekundärantikörper mit Cy3 (Cyanin, rot fluoreszierend) gekoppelt war. Die Untersuchung des Endothelmarkers CD31 erfolgte mit der 3-Schritt-Methode. Hierbei ist der Sekundärantikörper nicht mit einem Farbstoff konjugiert, sondern mit dem Vitamin Biotin gekoppelt (biotinierter Sekundärantikörper). In einem zusätzlichen Schritt erfolgt die Zugabe von Streptavidin (ein Protein des Bakteriums *Streptomyces avidinii*), welches an das Enzym Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt ist. Die nun hinzugegebene chromogene Substanz 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) wird durch HRP in einen rot-bräunlichen Farbstoff umgesetzt.

Insgesamt lagen von jeder VSM eines Patienten mehrere kurze Stücke für die immunhistologische Untersuchung vor (siehe Abbildung 3 in Kapitel 2.5). Hierdurch konnten für jede VSM mehrere histologische Schnitte angefertigt werden. Ziel war hierbei mögliche punktuell verstärkte oder verminderte Schädigungen des Endothels auszugleichen.

2.6.4.1 Färbeprotokolle

Die ausgewählten Schnitte (nach Ansicht der HE-Färbungen) wurden alle mittels Gefriermikrotom geschnitten und mit einem beschichteten Objektträger aufgenommen.

Zur Untersuchung des Markers CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1) wurden die Gewebeschnitte anschließend für 10 min in eiskaltem Aceton (- 20 °C) fixiert, da dieses zu einer raschen Verdrängung des intrazellulären Wassers und somit zu einem entwässernden Effekt führte. Die nun fixierten Schnitte wurden kurz an der Luft getrocknet und die einzelnen histologischen Schnitte danach mit einem Fettstift eingekreist um ein Abfließen der Inkubationslösungen von den Schnitten und somit ein Austrocknen während der verschiedenen Arbeitsschritte zu verhindern. Die folgenden Inkubationsschritte wurden entsprechend dem Protokoll des von R&D Systems gefertigten Cell and Tissue Staining Kit (HRP-AEC System) durchgeführt.

Es folgten mehrere Inkubationsschritte mit verschiedenen Blocking Reagenzien. So wurden in den Schnitten mögliche endogene Peroxidase Aktivitäten als auch endogen vorhandenes Biotin, Avidin und Serum geblockt. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten folgten meist Waschschrte bei RT mit PBS-Lösung (siehe Kapitel 7.5.8). Am Ende des ersten Tages folgte die Inkubation der Venenschnitte mit dem Primärantikörper, welcher sich gegen das Protein CD31 richtete. Dieser Inkubationsschritt wurde in einer abgedunkelten und feuchten Kammer, um das Abbleichen und Austrocknen der Schnitte zu vermeiden, über Nacht (mind. 12 h) bei + 4 °C durchgeführt. Die verschiedenen Primärantikörper und ihre jeweiligen Konzentrationen können der Tabelle im Anhang in Kapitel 7.5.5.1 entnommen werden.

Am zweiten Tag wurde der Primärantikörper durch gründliches Waschen in PBS von den Schnitten abgewaschen und es folgte die einstündige Inkubation mit einem an Biotin gekoppeltem Sekundärantikörper. In dem folgenden Schritt wurde nun eine Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase Lösung hinzugegeben, welches sich an das Biotin anlagerte und die im letzten Schritt hinzugegebene chromogene AEC-Lösung enzymatisch in roten Farbstoff umwandelte. Nach gründlichem Waschen wurden die Schnitte nochmals mit Hämatoxylin gegengefärbt und abschließend mit Mowiol eingedeckelt.

Bei jeder Färbereihe wurden parallel zum normalen Protokoll 1 - 2 Negativkontrollen durchgeführt. Bei diesen wurde kein Primärantikörper verwendet, sodass hier keine Farbreaktion stattfinden sollte. Mithilfe der Negativkontrollen konnte eine unspezifische Antikörperbindung und somit falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen werden.

In der nachfolgenden Tabelle, kann das Färbeprotokoll für den Endothelmarker CD31 nachvollzogen werden:

	Schritt	Substanz	Temp.	Dauer
1	Fixierung	Aceton	-20°C	10 min
2	-	Fettstift	RT	-
3	Blocken	Peroxidase Blocking Reagenz	RT	5 min
4	Waschen	PBS	RT	5 min
5	Blocken	Serum Blocking Reagenz	RT	15 min
6	Abtupfen	-	RT	-
7	Blocken	Avidin Blocking Reagenz	RT	15 min
8	Waschen	PBS	RT	15 min
9	Blocken	Biotin Blocking Reagenz	RT	15 min
10	Waschen	PBS	RT	15 min
11	Inkubation	Primärantikörper (Anti-CD31, 1:100)	4°C	über Nacht
12	Waschen	PBS	RT	15 min
13	Inkubation	Biotinilierter Sekundärantikörper	RT	1 h
14	Waschen	PBS	RT	2 x 15 min
15	Inkubation	High Sensitivity Streptavidin – Meerettich Peroxidase (HSS-HRP)	RT	30 min
16	Waschen	PBS	RT	3 x 2 min
17	Inkubation	AEC Chromogen	RT	15-20 min
18	Waschen	Aqua dest.	RT	5 min
19	Färbung	Hämatoxylin	RT	1-5 min
20	Bläuen	Lauwarmes H ₂ O	RT	1 min
21	Eindeckeln	Mowiol	RT	-

Tabelle 5: Färbeprotokoll für CD31. Meerrettich-Peroxidase Färbekit der Firma R&D Systems

Zur fluoreszenzhistochemischen Analyse der Targets eNOS, ICAM-1 und P-Selectin erfolgte die Fixierung der Schnitte in Paraformaldehyd 4 % (PFA) für 5 min bei RT. Es folgte kurzes mehrmaliges Waschen in PBS. Anschließend erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers (Konzentration 1:100 und 50 µl pro Schnitt, siehe Kapitel 7.5.5.1). Die Inkubation erfolgte in einer abgedunkelten und feuchten Kammer über 1 Stunde

bei RT. Anschließend wurde der Primärantikörper in PBS-Lösung vorsichtig abgewaschen und die Schnitte daraufhin mit dem Sekundärantikörper, welcher mit dem Farbstoff Cy3 gekoppelt vorliegt, für 45 min bei RT inkubiert (Konzentration 1:300 und 50 µl pro Schnitt, siehe Kapitel 7.5.5.2). Der Antikörper wurde anschließend erneut mittels PBS-Lösung abgewaschen. Es folgte die Inkubation (20 min bei RT) mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-diamino-2-phenylindol (DAPI, Konzentration 1:1000 und 50 µl pro Schnitt), welcher sich an die DNA anlagert und somit die Zellkerne blau anfärbt. Zum Abschluss wurde DAPI in PBS-Lösung abgewaschen und die Schnitte mit Mowiol eingedeckelt.

In der nachfolgenden Tabelle ist das Färbeprotokoll für die Targets eNOS, ICAM-1 und P-Selectin dargestellt:

	Schritt	Substanz	Temp.	Dauer
1	Fixierung	PFA 4%	RT	5 min
2	Waschen	PBS	RT	3 x 3 min
3	Inkubation	Primärantikörper (1:100, Maus) Anti-eNOS, Anti-ICAM-1 & Anti-P-Selectin	RT	60 min
4	Waschen	PBS	RT	3 x 3 min
5	Inkubation	Sekundärantikörper mit Cy3 (1:300, Donkey Anti-Maus)	RT	45 min
6	Waschen	PBS	RT	3 x 3 min
7	Inkubation	DAPI (1:1000)	RT	20 min
8	Waschen	PBS	RT	3 x 3 min
9	Eindeckeln	Mowiol	RT	-

Tabelle 6: Färbeprotokoll für eNOS, ICAM-1 und P-Selectin.

2.6.5 Mikroskopie

2.6.5.1 Lichtmikroskopie und Auswertung

Mit Hilfe der Lichtmikroskopie wurden alle HE- als auch die immunhistologischen Meerrettich-Peroxidase Färbungen einer ersten Beurteilung unterzogen. Die Untersuchungen wurde unter 1,6-, 10- und 20-facher Vergrößerung durchgeführt. Bei den HE-Färbungen richtete sich das Augenmerk hauptsächlich auf die grobe Beurteilung der Probenqualität. Indem auf die Integrität der Gefäßwand geachtet wurde, konnte eine Auswahl an geeigneten Proben für die folgenden immunhistologischen Untersuchungen getroffen werden.

Bei den CD31-Färbungen wurde die Lichtmikroskopie für die quantitative Analyse der Endothelstrecke verwendet. Durch Fotos bei 10- bis 20-facher Vergrößerung konnte eine spätere Ausmessung der Endothelstrecke mithilfe des Programms ImageJ (National Institutes of Health, USA) erfolgen. Zusätzlich erfolgte die Messung der gesamten inneren Lumenstrecke. Die gemessene Endothelstrecke wurde anschließend in Relation zur Lumenstrecke gesetzt und somit als prozentualer Endothelanteil am Gesamtlumen angegeben. Die Messung des Endothels geschah verblindet ohne Wissen um die Gruppenzugehörigkeit einer Probe.

2.6.5.2 Fluoreszenzmikroskopie

Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnten die fluoreszierenden Antikörper und Farbstoffe aus dem Färbeprotokoll in Tabelle 6 sichtbar gemacht werden. Mittels verschiedener optischer Filter konnten die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe separat angeregt und erfasst werden. So wurden zunächst Bilder der Zellkerne (DAPI-Farbstoff) angefertigt. Im Anschluss folgte eine Aufnahme des Cy3-Farbstoffs. Beide Bilder konnten dann übereinandergelegt werden und somit ein Bezug zwischen Zellen und angefärbtem Target hergestellt werden. Die Schnitte wurden unter 10-, 20-, 40- und 63-facher Vergrößerung beurteilt.

2.7 Molekularbiologische Verfahren

2.7.1 Relative quantitative Analyse von RNA

Unter der Real Time Polymerase Kettenreaktion (real time PCR) versteht man die quantitative Analyse von RNA durch Messung der Fluoreszenzsignale in Echtzeit während der PCR. Als Fluoreszenzfarbstoff dient hierbei ein markierter Primer, welcher zu Beginn der PCR hinzugegeben wird und spezifisch an die gesuchte Gensequenz bindet. Die Messung der Lichtemission verhält sich direkt proportional zur amplifizierten Nukleinsäure-Menge während der PCR und kann über den CT-Wert (Cycle Threshold, Zyklus Schwellenwert) charakterisiert werden. Dieser Wert beschreibt den Anfangspunkt der exponentiellen Phase und somit den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig deutlich über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

2.7.1.1 RNA-Isolation

Die Isolierung der RNA aus dem Probenmaterial erfolgte mithilfe des RNeasy Micro Kits und dem vollautomatischen QiaCube der Firma Qiagen. Prinzip dieser Methode ist die Fähigkeit der RNA, sich an einer mit Silikat beschichteten Membran zu binden, während alle anderen Verunreinigungen durch Microspintechologie und spezielle Säulen (RNeasy Spin Column) entfernt werden.

Zu Beginn wurden beta-Mercaptoethanol (Lösemittel) und RLT-Puffer (lytische Wirkung auf Zellen) einem Verhältnis von 1:100 gemischt. 300 µl dieser Puffer-Lösung wurden mit einer Metallkugel (ø 5 mm) in ein 2 ml-Tube gegeben. Hierzu wurden anschließend je 1 - 2 dünne Scheiben der gefrorenen (- 80 °C) Venen hinzugefügt. In der Folge wurden die Proben für 4 min mit einer Kugelschwingmühle bei einer Frequenz von 20 Hz geschüttelt, wodurch eine mechanische Zerkleinerung stattfand. Durch den RLT-Puffer wurde eine Zerstörung der Membranintegrität mit Freisetzung der gesamten zytoplasmatischen Nukleinsäuren und Proteine ausgelöst. Das beta-Mercaptoethanol sorgte zusätzlich für einen raschen Abbau von enthaltenen RNasen, sodass ein Abbau der enthaltenen RNA früh verhindert werden konnte. Nach Homogenisierung der Proben im Mixer-Mill schloss sich eine 3-minütige Zentrifugation bei 13.200 rpm an. Danach wurde der Überstand, welcher die freigesetzte Gesamt-RNA enthielt, in ein neues 2 ml-Tube überführt und als Ausgangssubstanz in den QiaCube gestellt. Parallel hierzu wurden je eine Lösung aus 140 µl Proteinkinase K (Abbau von RNA) und 1815 µl RNase freiem H₂O, als auch 135 µl DNase (Abbau von DNA) und 942 µl RDD-Puffer (optimiert DNA-Verdau) hergestellt. Diese beiden Lösungen wurden ebenfalls in den vollautomatischen QiaCube gestellt und anschließend das RNA-Isolationsprogramm gestartet.

Im folgenden Schema werden alle im QIAcube ablaufenden Schritte dargestellt und erklärt:

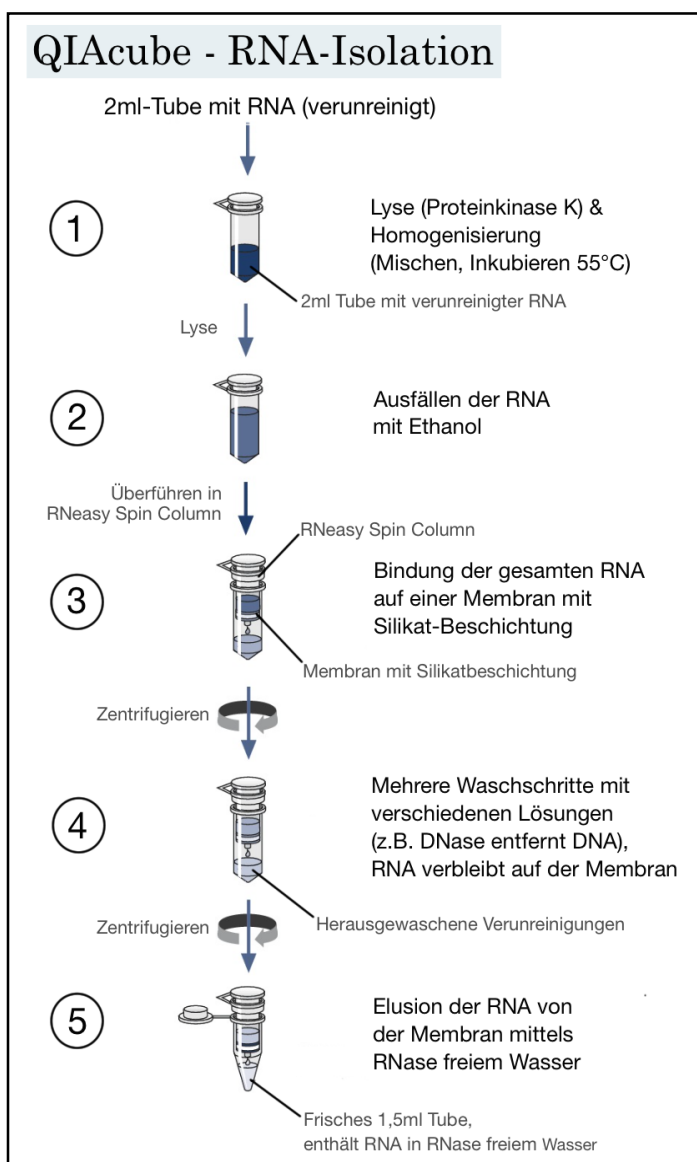


Abbildung 4:
Schema der RNA-Isolation im vollautomatischen QIAcube.

1. Lyse & Homogenisierung: Durch Zugabe von Proteinkinase K wird eine weitere Lysierung der Zellen und Freisetzung der gesamten RNA aus dem Gewebe erreicht. Wichtigster Mechanismus ist jedoch der Schutz der RNA durch die Proteinkinase K vor dem Abbau durch unspezifische RNasen.

2. Ausfällen der RNA: Durch Zugabe von Ethanol fällt die RNA aus der Lösung aus und kann nun in das RNeasy Spin Column überführt werden.

3. RNA-Bindung an Silikat-Membran: Die ausgefällte RNA bleibt an der mit Silikat beschichteten Membran hängen, während die restliche Flüssigkeit durch Zentrifugation durch die Membran hindurchtritt.

4. Weiteres Auswaschen von Verunreinigungen: Es folgen mehrere Waschschritte mit verschiedenen Lösungen um letzte Verunreinigungen zu entfernen (DNase entfernt enthaltene DNA).

5. Elution der RNA: Durch Zugabe von RNase freiem H₂O wird die RNA resuspendiert, von der Membran gelöst und in einem frischen 1,5 ml Tube aufgefangen.

(Schema nach Qiagen GmbH, Hilden, D)

2.7.1.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Nach Abschluss der RNA-Isolation durch den QIAcube lag die RNA gelöst in 30 µl RNase freiem H₂O vor. Diese Lösung wurde nun mithilfe eines Spektrophotometers auf die RNA-Konzentration hin untersucht. Hierbei wurden 2 µl der RNA-Lösung auf das Testfeld gegeben und anschließend durch Lichtabsorption die darin enthaltene RNA gemessen. Nach RNA-Konzentrationsmessung aller Proben, wurde alle Proben mit einer RNA-Konzentration $\geq 5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ zur weiteren Untersuchung in die Studie eingeschlossen.

2.7.1.3 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Das Umschreiben der RNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgt mittels reverser Transkription.

Die Umschreibung wurde nach dem SuperScript®-Protokoll der Firma Invitrogen (Calrsbad, CA, USA) durchgeführt. Die verwendete Gesamt-RNA-Menge wurde auf 50 ng festgelegt und die einzelnen Proben mit RNase freiem H₂O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Hierzu wurden je 1 µl Random Primer (Oligodeoxyribonukleotide, 3 ng/µl) und 1 µl dNTP-Mix (je 4 x 25 µmol dGTP, dCTP, dATP, dTTP) hinzugefügt. Anschließend wurde die Probe zur Anlagerung der Primer inkubiert (5 min bei 65 °C). Im nächsten Schritt wurden 2 µl DTT (Dithithreitol, 0,1M), 4 µl 5x First-Strand Puffer und RNaseOut (rekombinanter Ribonuklease Inhibitor, 40 U/µl) hinzugegeben und die Probe für 2 min bei 25 °C inkubiert. Hierbei konnte ein unspezifischer Abbau der RNA durch RNasen (Ribonuklease) verhindert werden. Im letzten Schritt wurde nun 1 µl SuperScript® II Reverse Transkriptase (200 U/µl, Temperaturoptimum 42 °C) hinzugefügt und die Synthese der DNA durch Inkubation für 50 min bei 42 °C durchgeführt. Zur Beendigung der cDNA-Synthese wurde die Transkriptase für 15 min bei 70 °C inaktiviert und die cDNA anschließend bei – 20 °C eingefroren.

Die reverse Transkription wurde für jede Probe exakt einmal durchgeführt, sodass nach einem Zyklus die Menge an RNA 1:1 in Intron-freie cDNA umgeschrieben wurde.

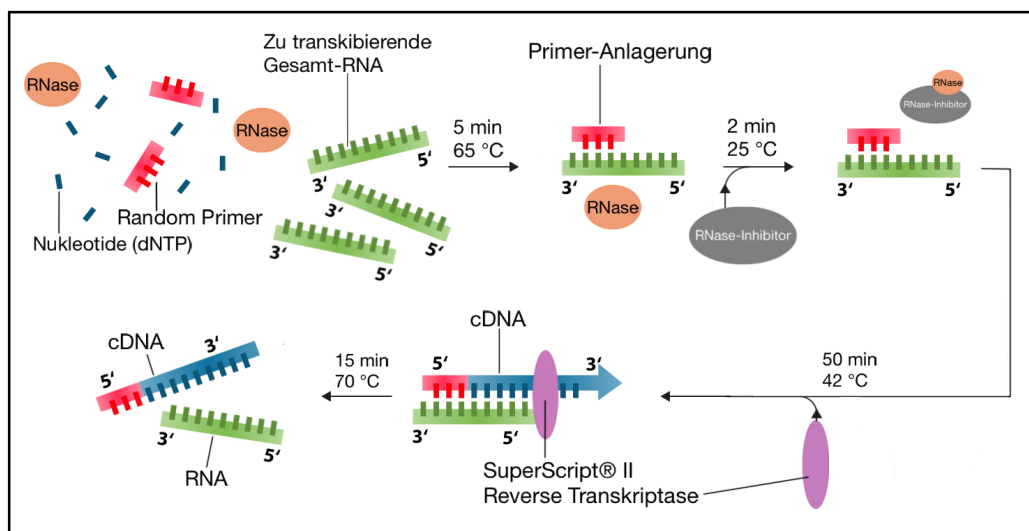


Abbildung 5: Schema der Reversen Transkription (SuperScript®-Protokoll).

Schematischer Ablauf der cDNA-Synthese. Im ersten Schritt werden Random Primer und Nukleotide im Überschuss zugefügt. Bei 65°C erfolgt die Anlagerung der Primer an die vorhandene RNA. Im nächsten Schritt wird ein RNase-Inhibitor hinzugefügt um einen unspezifischen Abbau der RNA durch Ribonukleasen zu verhindern. Nach Zugabe von einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (SuperScript® II Reverse Transkriptase), erfolgt die cDNA-Synthese bei 42°C. Durch Erhitzen auf 70°C wird die Syntheseleistung der Transkriptase gestoppt und es liegt ein 1:1 cDNA-Transkript der RNA-Menge vor.

2.7.1.4 Targets & Primer-Auswahl

Nach Festlegung der Targets erfolgte die Auswahl der Primer mittels der von Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) angebotenen TaqMan® Real-Time PCR Assays. Die ausgewählten PCR-Kits sind im Kapitel 7.5.7 aufgelistet.

Durch die TaqMan® Kits konnte eine Bestimmung der konkreten cDNA-Sequenz entfallen, da vom Hersteller eine gewisse Transkriptspezifität, sowie Primer mit möglichst wenigen repetitiven Sequenzen angeboten werden. Eine konkrete Auswahl der Kits erfolgte nach den Kriterien Primer-Länge (zwischen 50 und 150 Basenpaaren) und Überspannen einer Exongrenze.

Zur Normalisierung der PCR wurde ein Primer für das Referenz-Gen (Haushaltsgen) 18S der Firma Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, D) verwendet. Dieses wird konstitutiv und unabhängig von äußeren Einflüssen in allen Zelltypen exprimiert und kann somit zur Normierung der amplifizierten DNA-Menge herangezogen werden. Die DNA-Sequenzen für den forward und reverse Primer des 18S-Gens sind in Kapitel 7.5.6 dargestellt.

2.7.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

Ziel der von Kary Mullis 1985 entwickelten PCR (Mullis and Faloona, 1987) ist die in vitro Vervielfältigung von DNA, bzw. speziell ausgewählten DNA-Sequenzen. Während eines PCR-Zyklus findet mithilfe einer DNA-Polymerase eine Verdopplung der DNA-Menge statt. Durch Kopplung mehrerer Zyklen kann somit in kurzer Zeit eine exponentielle Amplifikation der gesuchten DNA-Sequenz stattfinden.

Ein Zyklus einer PCR kann in 3 Teilschritten eingeteilt werden:

1. Denaturierung:

Durch kurzes (hier: 15 Sekunden) Erhitzen auf 95 °C werden die Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren der DNA gelöst und die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge geteilt. Eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) widersteht einer Denaturierung (Lawyer et al., 1993).

2. Primer Anlagerung:

Ein Primer, welcher eine für das gesuchte Gen komplementäre spezifische Basenabfolge aufweist, lagert sich an die DNA. Dies geschieht durch Erhitzen auf ein für den Primer spezifisches Temperaturoptimum (hier 30 Sekunden bei 60 °C).

3. Elongation:

Die Taq-DNA-Polymerase erkennt den Primer und synthetisiert ausgehend von diesem in 5'-3'-Richtung entlang des Matrizen-DNA-Stangs einen neuen komplementären DNA-Strang. Dies geschieht bei einem Temperaturoptimum (hier: 30 Sekunden bei 60 °C). Gelegentlich falsch eingebaut Basen werden durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität („Proof Reading“) korrigiert.

Prinzipiell können diese 3 Einzelschritte eines Zyklus beliebig oft hintereinander wiederholt werden. In dieser Studie wurde jede PCR mit 45 Zyklen durchgeführt, sodass am Ende der gesuchte DNA-Abschnitt in ausreichender Anzahl vorlag.

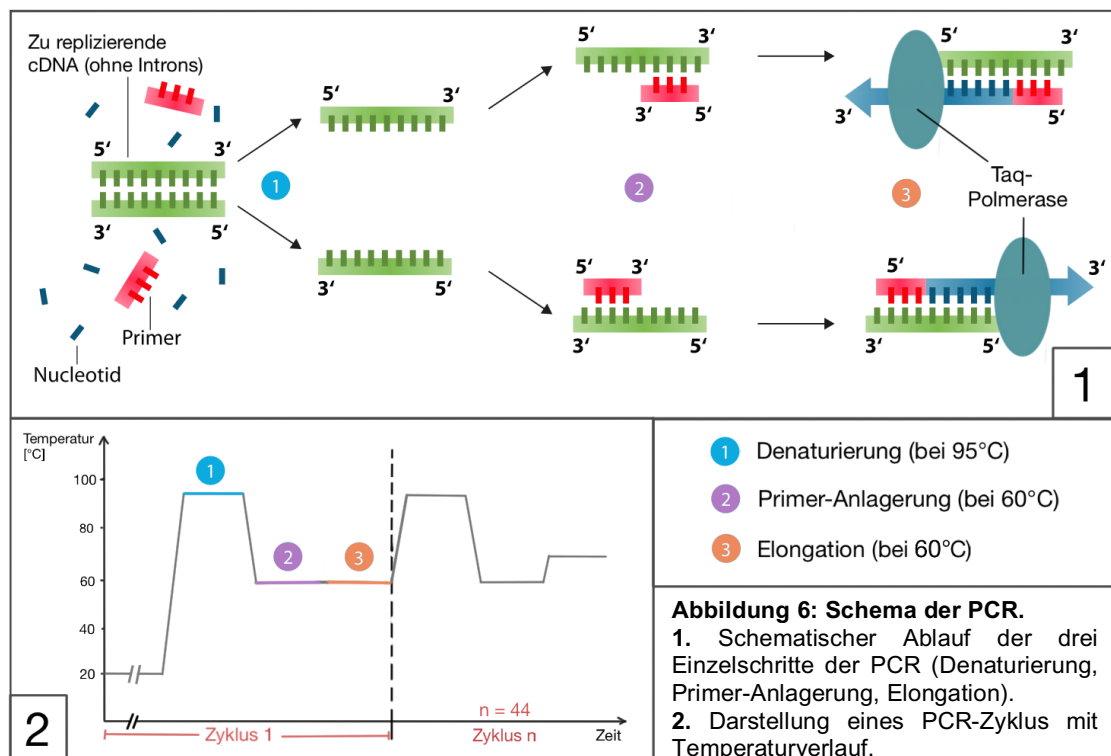


Abbildung 6: Schema der PCR.

1. Schematischer Ablauf der drei Einzelschritte der PCR (Denaturierung, Primer-Anlagerung, Elongation).

2. Darstellung eines PCR-Zyklus mit Temperaturverlauf.

2.7.1.6 Quantitative Real-Time PCR

In einer quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) kann mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs die Amplifikation der DNA-Sequenzen bei jedem Zyklusende der PCR in Echtzeit gemessen werden. Im Rahmen dieser Studie kamen zwei PCRs mit verschiedenen Farbstoffen zum Einsatz: SYBR Green qRT-PCR und TaqMan qRT-PCR.

Der Farbstoff SYBR Green ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff und besitzt die Fähigkeit, während der Amplifikation mit doppelsträngiger DNA zu interkalieren und hierdurch grün fluoreszierendes Licht bei einer Wellenlänge (λ) 521 nm zu emittieren. Leider wird bei dieser Methode ebenfalls die Fluoreszenz von unfertigen, falschen und unspezifischen PCR-Produkten gemessen. Aus diesem Grund wird zur Erfassung der Spezifität der PCR-Produkte eine Schmelzkurvenanalyse benötigt. Hierbei wird die Temperatur im Anschluss an die konventionelle PCR von 65 °C stetig bis 95 °C erhöht. Sobald nun der Doppelstrang eines spezifischen Amplifikats gespaltet wird, löst sich auch der SYBR Green Farbstoff aus der Interkalation und es entsteht ein messbarer Abfall der Fluoreszenz. Da die DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt aufweist als unspezifische Amplifikate, kann hierdurch eine Unterscheidung vorgenommen werden.

Das Prinzip der TaqMan-Kits hingegen beruht auf dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET). Dieser beschreibt einen strahlungsfreien Energietransfer von einem angeregten Farbstoff (Donor) auf einen zweiten Farbstoff (Akzeptor) (Förster, 1948). Die TaqMan-Kits beinhalten DNA-Sonden (TaqMan-Sonde, Hydrolyse-Sonde), welche am 5'-Ende einen Fluoreszenz-Donorfarbstoff (FAM = 6-FAM-phosphoramidit) und am 3'-Ende einen Fluoreszenz löschenden Akzeptorfarbstoff (Quencher, MGB/TAMRA = minor groove binder/Carboxytetramethylrhodamin) besitzen. Durch die räumliche Nähe kann ein Energietransfer stattfinden. Wird nun nach Anlagerung der TaqMan-Sonde an den DNA-Strang der Donorfarbstoff am 5'-Ende der Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase abgetrennt, so wird ein Energietransfer durch die entstehende räumliche Entfernung unterbunden und es wird eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzemission des Donorfarbstoffes (FAM) bei einer Wellenlänge (λ) von 518 nm messbar (Didenko, 2001). Vorteil des FRET bietet die spezifische Erfassung von fertigen DNA-Amplifikaten, sodass eine Schmelzkurvenanalyse entfällt.

Zur Durchführung der Normalisierungs-PCR für 18S-rRNA wurde die SYBR Green Methode gewählt. Zu Beginn wurden die Forward und Reverse Primer (siehe

Kapitel 7.5.6) auf 1:10 verdünnt und nach folgendem Schema (Tabelle 7) mit Braun Aqua und Power SYBR® Green PCR zu einem Master-Mix zusammen pipettiert. Dieser Master-Mix enthielt die Primer (forward und reverse), dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate), den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green und eine Taq-Polymerase. Hieraus wurden in jedes Well der 96-well Platte 19 µl Master-Mix pipettiert und anschließend in jedes Well eines Probetriplikats je 1 µl cDNA hinzugefügt.

	Substanz	Volumen pro Triplikat einer Probe	Volumen pro Well
1	Master-Mix (18S)		
	18S Primer forward	1,4 µl	19 µl
	18S Primer reverse	1,4 µl	
	B.Braun Aqua	27,9 µl	
	Power SYBR® Green PCR Master Mix (enthält SYBR Green & AmpliTaq Gold® DNA Polymerase)	34 µl	
2	Probe (cDNA)	3 µl	1 µl

Tabelle 7: Master-Mix Ansatz für die SYBR Green Real Time PCR.

Zur Messung der Targets eNOS, VCAM-1, ICAM-1 und P-Selectin wurden die TaqMan-Sonden verwendet. Hierbei wurde ebenfalls ein Master-Mix nach folgendem Schema erstellt (Tabelle 8). Die TaqMan Kits enthielten die für das gesuchte Target vom Hersteller getestete Primer (siehe Kapitel 5.7.7), sowie mit einem Farbstoff-Donor und Fluoreszenz unterdrückendem Quencher beladene DNA-Sonden. Nach Anfertigung des Master-Mix wurde analog zur SYBR Green Methode ebenfalls je 19 µl Master-Mix pro Well, sowie anschließend je 1 µl cDNA pro Probentriplikat zusammen pipettiert.

	Substanz	Volumen pro Triplikat einer Probe	Volumen pro Well
1	Master-Mix (18S)		
	TaqMan Kit (enthält Primer und TaqMan-Sonden mit FAM-Farbstoff & MGB-Quencher)	3,4 µl	19 µl
	B.Braun Aqua	27,9 µl	
	TaqMan Gene Expression Master Mix (enthält AmpliTaq Gold® DNA Polymerase und dNTP)	34 µl	
2	Probe (cDNA)	3 µl	1 µl

Tabelle 8: Master-Mix Ansatz für die TaqMan Real Time PCR.

Nach Abschluss des Pipettierens enthielt jedes Well 20 µl Ansatz (19 µl Master-Mix + 1 µl cDNA). Die 96-well Platte wurde anschließend mit einer Haftfolie luftdicht verschlossen und kurz bei 4 °C und 1000 rpm (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert, um mögliche Luftblasen zu entfernen.

Hierauf folgte die PCR mit den Zykluseinstellungen aus Tabelle 9. Bei beiden Methoden wurde als Negativkontrolle jeweils das letzte Triplikat der 96-well Platte mit 3 µl H₂O (1 µl pro Well) statt mit cDNA befüllt.

	Schritt	Temperatur	Dauer	
1	Aktivierung der AmpErase®	50°C	2 min	Einmalig zu Beginn der PCR
2	Aktivierung der DNA-Polymerase, Inaktivierung von	95°C	10 min	
3	Denaturierung	95°C	15 Sek.	45 Zyklen
4	Primer-Anlagerung	60°C	30 Sek.	
5	Elongation	60°C	30 Sek.	

Tabelle 9: Zykluseinstellungen der Real-Time PCR.

1. Aktivierung der AmpErase®, welche alle dUTP-Kontaminationen aus dem cDNA-PCR-Ansatz entfernt. 2. Aktivierung der DNA-Polymerase, sowie Inaktivierung der UNG (Uracil-N-Glykosylase) und Abbau von verdauter dU-DNA. 3. Denaturierung der DNA-Doppelstränge. 4. Primer-Anlagerung an spezifische DNA-Abschnitte. 5. Elongation des DNA-Strangs am 3'-Ende des Primers durch die Taq-Polymerase. Die Schritte 3, 4 und 5 wurden insgesamt 45 mal wiederholt, bis eine ausreichende Anzahl an DNA-Kopien vorlag.

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte mittels des Programms CFX Manager (BioRad Laboratories GmbH, München, D).

Durch das Programm wurde der CT-Wert (Cycle Threshold) jeder Probe in Echtzeit bestimmt. Unter dem CT-Wert versteht man den Zyklus, an dem erstmalig eine deutliche Fluoreszenzzunahme über die Hintergrundfluoreszenz registriert wird. Er stellt somit den Beginn der exponentiellen Wachstumsphase dar. Um eine relative Quantifizierung der DNA-Menge zu ermöglichen, wurden die CT-Werte jeder Probe eines Referenz-Gens (hier: 18S-rRNA) gemessen. Hierzu konnten die CT-Werte des Zielgens normalisiert werden, um die relative Menge zu erhalten (ΔCT). Mithilfe des Programms CFX Manager konnte anschließend die normalisierte Expression ($\Delta\Delta CT$) ermittelt werden. Da die TaqMan Kits eine Effektivität von nahezu 100% in einem PCR-Zyklus garantieren, konnte auf eine Effizienzkorrektur verzichtet werden und der Fold Change mithilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet werden (Livak and Schmittgen, 2001).

2.7.2 Semi-Quantitative Analyse von Proteinen (Western-Blot)

Zur semi-quantitativen Analyse von Proteinen wurde die von Burnette 1979 erstmals entwickelte Methode des Western-Blots verwendet (Burnette, 1981). Bei dieser Technik wird die Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe und Ladung mittels einer Gelelektrophorese erreicht. Anschließend werden die Proteine auf eine Trägermembran übertragen („Blotting“) und dort mithilfe von spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht.

2.7.2.1 Proteinisolierung aus Gewebestücken

Zu Beginn des Proteinnachweises mittels Western-Blot erfolgte das Lösen der Proteine aus den festen Gewebestücken, bevor im folgenden Schritt eine Konzentrationsbestimmung erfolgen konnte.

Es wurden 100 ml eines Präparationspuffers (pH 7,4, Zusammensetzung siehe Anhang) hergestellt und darin ein Protease Inhibitor gelöst (Roche complete mini EDTA-free Tablette). Im Anschluss wurden 1 - 2 dünne Venenstücke (ca. 1 - 2 mm Länge) mit ca. 80 - 100 μ L des Präparationspuffer-Protease-Inhibitor Gemischs in ein 1,5 ml großes Tube gegeben. Nach Zugabe von 2 kleinen Metallkugeln (\varnothing 3 mm) wurden die Gewebestücke für 4 min bei einer Frequenz von 20 Hz in einer Schwingmühle geschüttelt. Hierdurch wurde das Gewebe durch die Kugeln mechanisch zerkleinert. Durch die lysierende Wirkung des Puffers auf die Zellwand konnten die Proteine freigesetzt werden und gleichzeitig durch den Protease-Inhibitor vor einem enzymatischen Abbau geschützt werden. Nach dem Schütteln wurden die Proben in den Tubes kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt (Zieltemperatur ≤ 4 °C). Es folgte eine Zentrifugation der Proben für 2 min bei 14.000 rpm und + 4 °C. Im letzten Schritt wurde der Überstand nun vorsichtig mittels einer Pipette in ein frisches Tube überführt und bis zur Konzentrationsbestimmung erneut auf Eis gelagert.

2.7.2.2 Quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der quantitativen Proteinkonzentration wurde das DCTM (Detergent Compatible) Protein Assay Kit der Firma BioRad (München, D) verwendet, welches auf der von Lowry et al. (Lowry et al., 1951) eingeführten Methode beruht, jedoch eine schnellere maximale Farbentwicklung sowie eine stabilere Farbkonsistenz über die Zeit aufweist.

In eine 96-Well-Mikrotiterplatte wurden je 5 μl der zu messenden Proteinkonzentrationen in einer 1:10-Verdünnung (2 μl Probe + 18 μl dd H_2O) als Triplikate aufgetragen. Hierzu wurde im folgenden Schritt 25 μl der Reagenz A (alkalische Lösung mit Kupferionen) hinzugefügt. Nach Zugabe von 200 μl der Reagenz B (Folin/Lowry-Reagenz) wurde die Platte für 15 min im Dunkeln und bei RT inkubiert. Anschließend folgte die photometrische Messung des Farbumschlags im ELISA-Reader bei RT und einer Wellenlänge (λ) von 750 nm. Aus dem linearen Verhältnis der entwickelten Farbintensität und der enthaltenen Proteinmenge wurde die Proteinkonzentration für jede Probe errechnet. Als Vergleichswerte diente hierzu eine Kalibrierungskurve aus Triplikaten von Rinderserum (BSA = Bovine Serum Albumin) mit aufsteigender Konzentration.

2.7.2.3 SDS-Gelelektrophorese

Zur Analyse der Proteine wurden diese in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) anhand ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Durch die negative Ladung der Nukleinsäuren (Phosphatgruppen) wandern die Proteine je nach Größe unterschiedlich schnell entlang einer elektrischen Spannung durch eine Gel-Matrix zur Anode (Pluspol) hin. Kleine Proteine wandern schnell durch das Gel und können somit am unteren Rand des Gels sichtbar gemacht werden, während große Proteine nur langsam durch die Gel-Matrix wandern und somit im oberen Teil des Gels verbleiben. Das Prinzip der Gelelektrophorese ist in Abbildung 7 veranschaulicht.

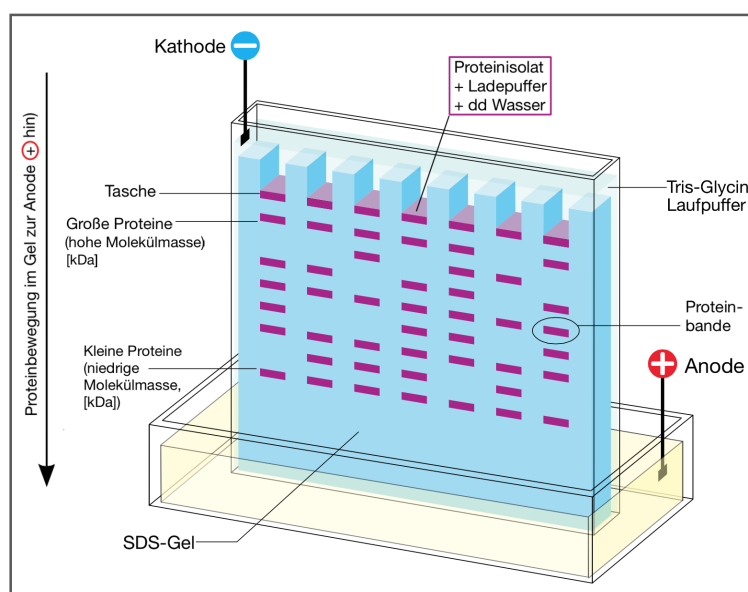


Abbildung 7: Schema der elektrophoretischen Protein-Auftrennung in einem Polyacrylamid-Gel.
(nach BioRad Laboratories GmbH, München, D)

Im Rahmen dieser Studie wurden 4-20% Polyacrylamid-Gele (Criterion™ TGX™ Gel, Bio-Rad GmbH, München, D) verwendet. Nach Ziehen des Kamms und Befüllen der Elektrophoresezelle mit Tris-Glycin-Puffer wurden 30 µg Proteinlysate mit ddH₂O und Ladepuffer (4x) in die Taschen gefüllt. Als Kontrolle wurde in die erste Tasche ein Protein-Standard (Precision Plus Standard, Bio-Rad GmbH, München, D) mit bekannten Proteingrößen pipettiert. Leere Taschen wurden zur Vermeidung eines „Smiley Effekts“ mit Ladepuffer gefüllt. Anschließend wurde die Elektrophorese für 100 min bei 150 V durchgeführt.

Nach Testung der Gelelektrophorese ergaben sich für die verschiedenen Proben bessere Ergebnisse bei vorherigem Aufbrechen der Sekundär- und Tertiärstruktur. So wurden die Proben vor Testung auf die Targets eNOS und P-Selectin für 5 min bei 95 °C denaturiert um eine Spaltung der Wasserstoffbrücken zu erreichen. Vor Testung auf ICAM-1 wurde jeder Probe 2 µl eines 10-fach konzentrierten Reduktionsmittels (NuPAGE, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) zugegeben um die Disulfidbrücken aufzubrechen.

2.7.2.4 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran

Der Transfer der Proteinbanden vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgt in sog. „Sandwich-Technik“ und beruht ebenfalls auf der Proteinbewegung entlang eines elektrischen Spannungsfeldes (siehe Abbildung 8).

In dieser Studie wurde ein Nitrocellulose Transfer Pack (Bio-Rad GmbH, München, D) verwendet, welches bereits ein fertiges Filterpapier-Membran-Filterpapier-Sandwich enthielt. Es wurde somit lediglich das SDS-Gel zwischen Membran und Filterpapier platziert, mit einer Walze luftblasenfrei ausgerollt und anschließend für 10 min einer Spannung von 25 V (Stromstärke 2,5 Ampere) ausgesetzt.

Zur Kontrolle des Erfolgs des Proteintransfers sowie einer ersten Abschätzung der Proteinmenge wurde die Nitrozellulosemembran für 5 min mit PonceauS-Lösung gefärbt (Romero-Calvo et al., 2010). Zur Dokumentation wurde ein Bild gemacht und die Membran anschließend mit ddH₂O wieder entfärbt.

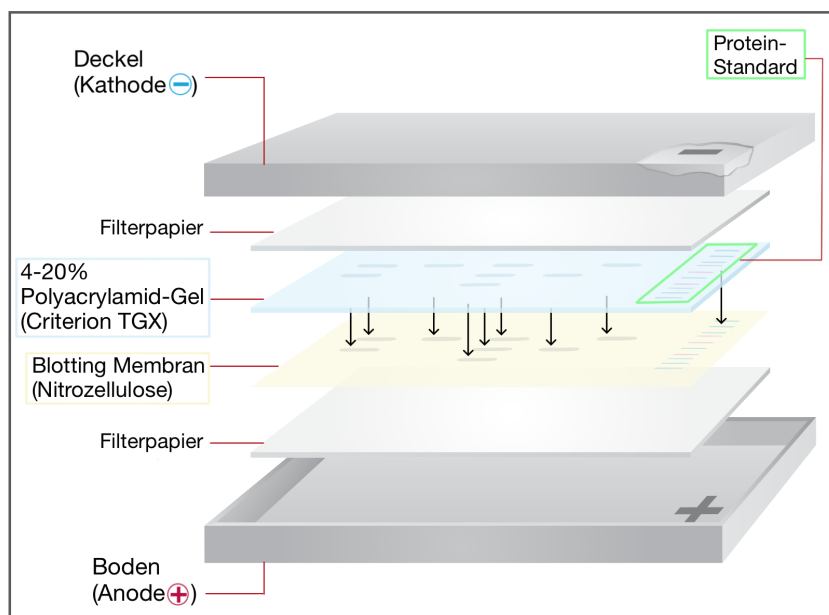


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Proteintransfers vom Gel auf eine Membran.
(nach BioRad Laboratories GmbH, München, D)

2.7.2.5 Proteindetektion

Zu Beginn wurde die Membran mehrere Stunden mit 20 ml TBST-Lösung (siehe Kapitel 7.5.8) inkubiert. Hierdurch wurden freie unspezifische Proteinbindungsstellen blockiert und eine unspezifische Anlagerung der Antikörper verhindert. Nach mehreren Waschschritten (zum Lösen aller ungebundener Milchpulver-Reste) wurde die Membran mit dem Primärantikörper inkubiert (über Nacht bei 4°C; siehe Kapitel 7.5.5.3).

Hierauf folgten am nächsten Tag mehrere Waschschrritte, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Im Anschluss wurde die Membran mit einem mit Meerrettich-Peroxidase (HRP, Horseradish Peroxidase) gekoppelten Sekundärantikörper [1:5000] inkubiert (90 min bei RT, siehe Kapitel 7.5.5.4). Um eine Kreuzreaktion des Sekundärantikörpers mit dem StrepTactin zu vermeiden, wurde der Protein-Standard getrennt mit einem HRP-gekoppelten StrepTactin inkubiert (60 min bei RT). Im Anschluss an die Inkubation wurden die überschüssigen Zweitantikörper mit TBST-Puffer abgewaschen.

Durch abschließende Zugabe eines Substrats konnte eine Detektion der mit Antikörper spezifisch markierten Proteinbanden in der Dunkelkammer erfolgen. Bei dem Substrat handelt es sich um die Chemilumineszenz Luminol (Aminophthalssäurehydrazid), welche durch HRP zu einem 3-Aminophthalat-dianion oxidiert wird. Dieses stellt ein instabiles Intermediat dar und geht unter Emission eines Photons im bläulichen Bereich in einen stabilen Zustand über (siehe Abbildung 9).

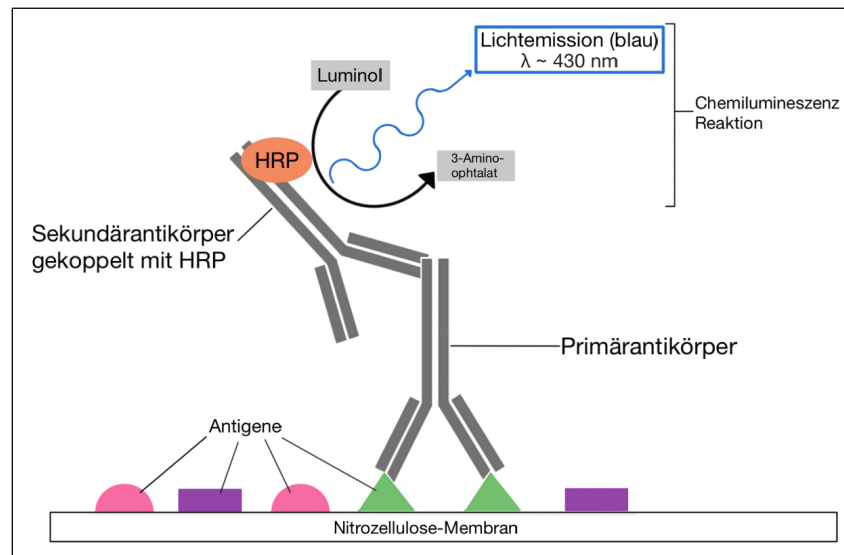


Abbildung 9: Schema der indirekten Immunfärbung.

Der Primärantikörper bindet spezifisch an ein Antigen auf der Nitrozellulose-Membran. Nach Abwaschen aller nicht gebundenen primären Antikörper, wird ein Sekundärantikörper hinzugegeben. Dieser bindet spezifisch an den Fc-Teil des ersten Antikörpers und ist mit dem Enzym HRP (Meerrettich-Peroxidase) gekoppelt. Im letzten Schritt erfolgt die Zugabe eines Substrats für das Enzym. Dieses oxidiert das Luminol und es werden Photonen bei einer Wellenlänge von ca. 430 nm emittiert (bläulicher Spektralbereich). Diese Lumineszenz kann mit einer CCD-Kamera dokumentiert werden.

Die Normalisierung der Proteinmenge erfolgte über die Detektion der GAPDH-Proteinband. Hierzu wurde die Membran erneut mehrmals mit TBST gewaschen, alle unspezifischen Bindungsstellen mit fettfreiem Milchpulver geblockt (90 min bei RT) und abschließend mit einem HRP gekoppelten GAPDH-Antikörper inkubiert (über Nacht bei 4 °C; Antikörper siehe Kapitel 7.5.5.3). Da dieser Antikörper bereits mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war, entfiel die Zugabe eines Sekundärantikörpers. Durch direkte Zugabe von Luminol (AceGlow) konnten die Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Die Detektion der Banden erfolgte wiederum in der Dunkelkammer.

2.7.2.6 Auswertung Western-Blot

Die Auswertung des Western-Blots erfolgte mithilfe des Programms Image Lab (BioRad Laboratories GmbH, München, D). Hierbei wurden die Pixelintensitäten der mit Antikörper spezifisch markierten Proteinbanden gemessen und in Arbitrary Units (AU, willkürliche Einheit) angegeben. Die Pixelintensität der Proteinbande entspricht der jeweils enthaltenen Menge des Targets, sodass durch Messung der Intensitäten ein relativer Vergleich der Target-Mengen möglich wird.

Jede gemessene Intensität eine Bande wurde auf das ebenfalls enthaltene Haushaltsgen GAPDH bezogen und somit normalisiert. Die nun ermittelten normalisierten Werte der Menge eines Targets wurden anschließend den zwei Gruppen zugeordnet.

2.8 Statistik

Die Aufbereitung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel 2011 für Macintosh (Version 15.13.4). Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Statistikprogramm SPSS Statistics Version 22 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland) durchgeführt.

Alle Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehler ($\text{mean} \pm \text{SEM}$) angegeben. Zur Überprüfung der Gauß'schen Normalverteilung aller erhobenen Daten wurde der Shapiro-Wilks-Test angewendet. Bei gegebener Normalverteilung wurde zum Vergleich der Ergebnisse der zwei Gruppen (VASOSHIELD vs. konventionell) ein t-Test für zwei unverbundene Stichproben durchgeführt. Lag keine Normalverteilung vor, so wurde zur Analyse der Daten der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Ein Ergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($p\text{-Wert} < 0,05$) galt als signifikant.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mithilfe des Programms SPSS Statistics zur Erstellung von Box-Plots und Balkendiagrammen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Endothelintegrität

Eine erste subjektive Beurteilung der Endothelintegrität erfolgte mittels HE-Färbung. Zur Quantifizierung der Endothelschäden erfolgte anschließend eine immunhistochemisch Beurteilung anhand des Endothelzellmarkers CD31.

3.1.1 HE-Färbung

Wie in Kapitel 2.5 und 2.6.3 beschrieben, wurden mehrere HE-Färbungen jeder Probe angefertigt und unter dem Lichtmikroskop begutachtet.

Das Augenmerk lag hierbei auf einer intakten VSM mit durchgängiger Gefäßwand ohne Risse oder technisch bedingte Artefakte. Die Gefäßstruktur und besonders die Endothelzellschicht konnten so einer ersten subjektiven Inspektion unterzogen werden. Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft HE-Färbungen von zwei VSM mit unterschiedlicher Endothelbeschaffenheit

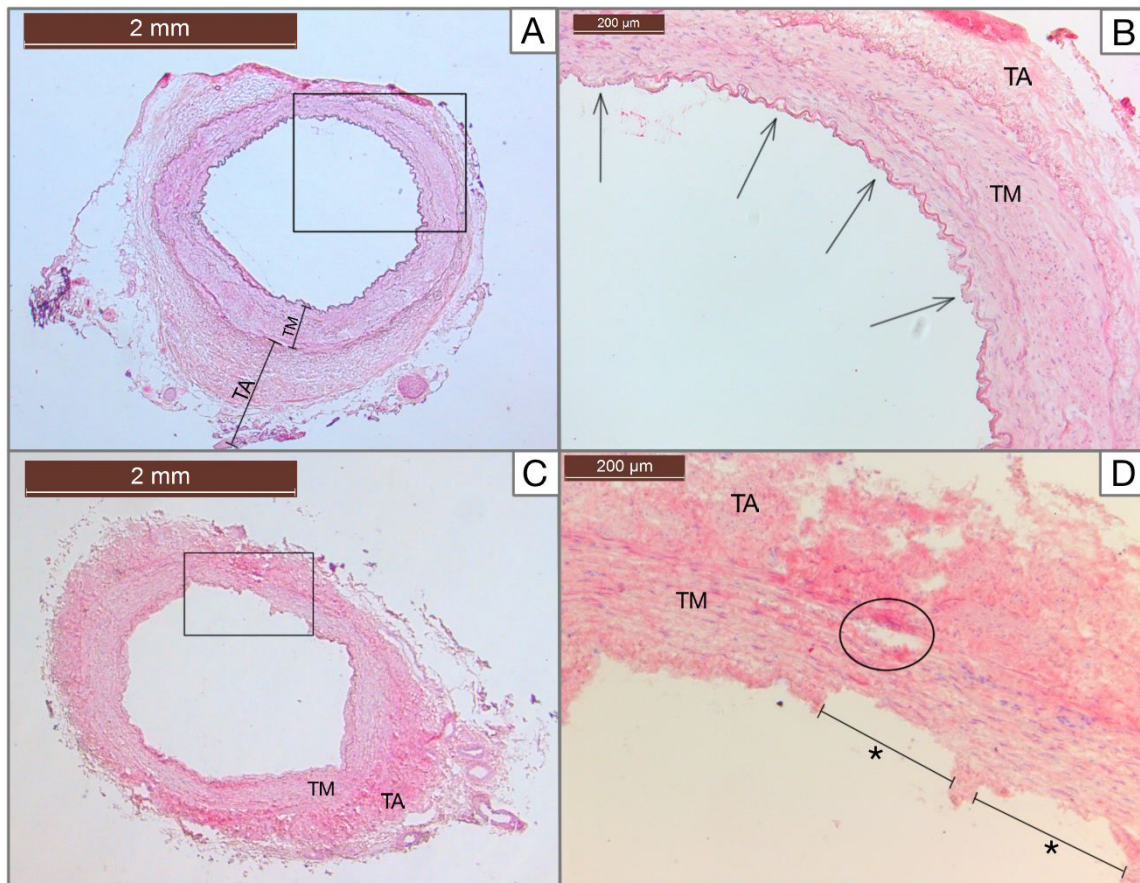


Abbildung 10: HE-Färbungen der VSM.

Bild A und B: VSM mit VASOSHIELD entnommen. Bild C und D: VSM mit konventioneller Spritze entnommen. Bild A und C: 1,6-fache Vergrößerung, Bild B und D: 10-fache Vergrößerung.

Der unterschiedliche Farbton der Bilder ist durch verschiedene Einstellungen beim Fotografieren unter dem Mikroskop bedingt.

Bild A und B zeigen eine intakte Gefäßstruktur mit intakter Tunica adventitia (TA), Tunica media (TM) und Tunica intima (TI). Die Pfeile (→) in Bild B zeigen eine intakte Endothelzellschicht. Bild C und D zeigen hingegen deutliche Endothelschäden (*) sowie einen Riss am Übergang der TM und TA (Kreis).

Wie in Abbildung 10 gezeigt, konnten deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Proben und zwischen einzelnen Färbungen der gleichen VSM gesehen werden. In Bild D sind teilweise großflächige Endothelschäden (*) und Schäden in der Gefäßwand (Kreis) zu erkennen, während in Bild A und B fast vollständig intaktes Endothel und eine intakte Gefäßstruktur zu erkennen sind.

Anhand der HE-Färbungen wurden schließlich geeignete Schnitte der verschiedenen Proben für eine weitere immunhistologische Untersuchung ausgewählt. Auswahlkriterium hierbei war eine intakte Gefäßstruktur ohne technisch bedingte Schädigungen der Schnitte.

3.1.2 Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül

Nach Auswahl geeigneter VSM-Abschnitte in der HE-Färbung erfolgte die immunhistologische Färbung des Endothelmarkers CD31 (siehe Protokoll in Kapitel 2.6.4.1).

Insgesamt konnten Proben aller 83 Patienten histologisch auf CD31 untersucht werden. Je nach Länge der VSM wurden unterschiedlich viele einzelne Schnitte einer VSM angefertigt. Im Durchschnitt konnten 3,4 histologische Schnitte einer VSM angefärbt werden (Minimum 1 Schnitt, Maximum 6 Schnitte).

Bei Ansicht unter dem Lichtmikroskop konnten, wie bereits bei den HE-Färbungen angedeutet, deutliche Unterschiede der Endothelbeschaffenheit festgestellt werden. Neben einem einfachen Verlust von Endothelzellen zeigten sich auch Risse der Endothelschicht bis in tiefere Schichten der Gefäßwand.

Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft zwei Bilder mit Unterschieden der mit CD31 angefärbten Endothelschicht. So sind in Bild B deutliche Risse und Endothelschäden (Kreise) sowie einzelne Stellen ohne CD31-Anfärbung (Pfeile) zu erkennen. In Bild A hingegen ist die Endothelschicht nahezu vollständig für CD31 angefärbt und somit erhalten und ohne größere Schäden.

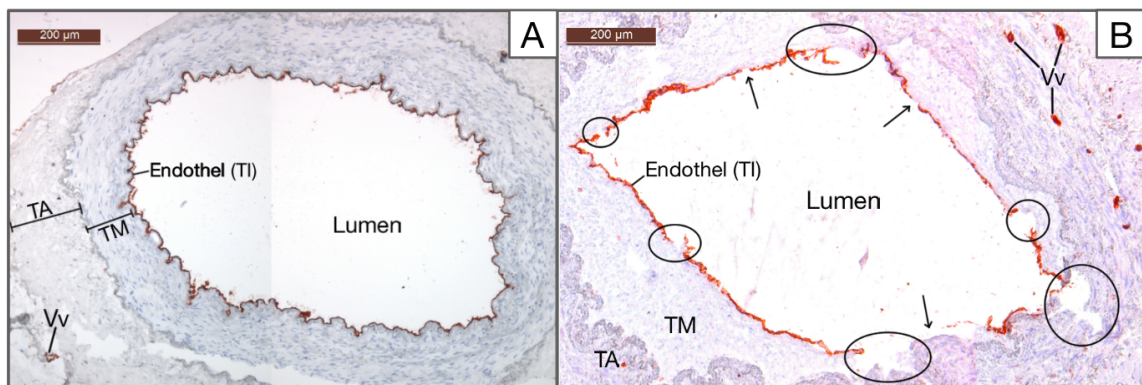


Abbildung 11: CD31-positive Endothelstrecke und Endothelschäden.

Bild A zeigt eine intakte Endothelstrecke mit durchgehend CD31-positiver Färbung (braun). In Bild B zeigt sich eine diskontinuierliche Endothelstrecke mit mehreren Rissen und Endothelunterbrechungen (Kreise), sowie vereinzelt Stellen ohne CD31-Anfärbung (→).

Vv = Vasa vasorum, deren Endothelzellen ebenfalls CD31 positiv angefärbt sind (braun). TA = Tunica adventitia, TM = Tunica media, TI = Tunica intima

Der unterschiedliche Farbton der Bilder ist durch verschiedene Einstellungen (z.B. Farbkontraste) beim Fotografieren unter dem Mikroskop bedingt.

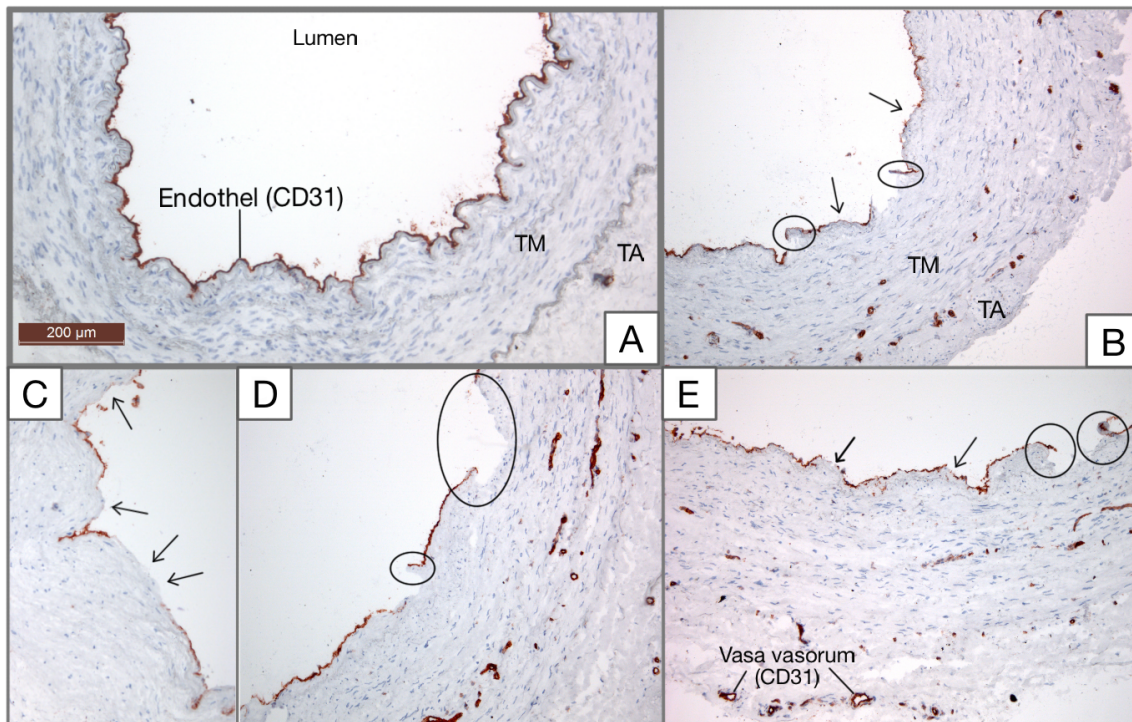


Abbildung 12: Vergleich der Endothelschäden (CD31) je nach Gruppe.

Bild A = VASOSHIELD; intakte Endothelstrecke (CD31 = braun).

Bild B bis E = konventionell; Es zeigen sich ausgeprägte Endothelschäden (Kreis = Riss im Endothel und Freilegung subendothelialen Gewebes, → = fehlendes Endothel). Die Endothelzellen der Vasa vasorum sind ebenfalls positiv für CD31 (braun).

TA = Tunica adventitia, TM = Tunica media.

In Abbildung 12 sind beispielhaft Proben der VASOSHIELD-Gruppe (Bild A) und Bilder der konventionellen Entnahmemethode (Bild B bis E) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei konventioneller Entnahme deutliche Endothelschäden (Kreise) und einzelne Bereiche im Endothel ohne CD31-Anfärbung (Pfeile) auftreten.

Beim Vergleich der gemessenen Endothelstrecken beider Gruppen zeigte sich eine längere Endothelstrecke bei Entnahme mittels VASOSHIELD-Spritze (CD31-Anteil: VASOSHIELD $57,93\% \pm 3,12$, $n = 40$ vs. konventionell $52,11\% \pm 3,56$, $n = 43$). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,225$, $n = 83$).

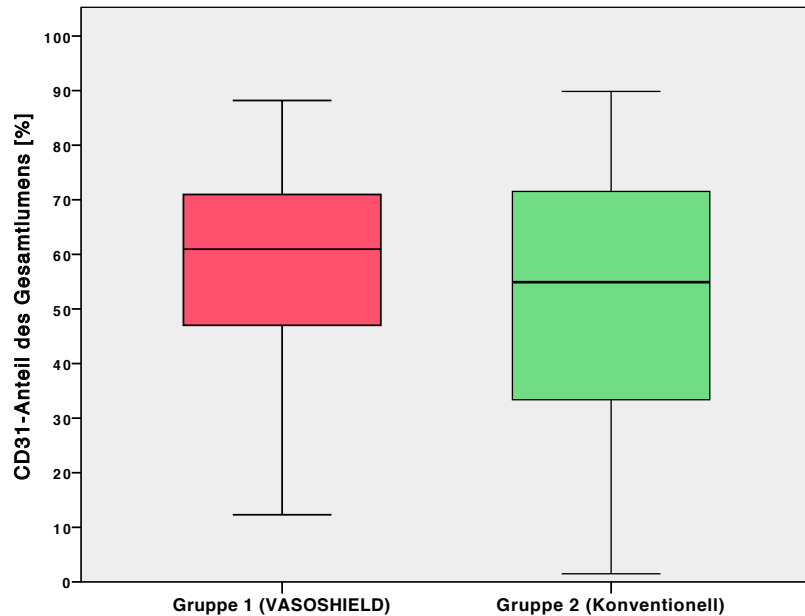


Abbildung 13: Boxplot mit CD31-Anteil nach Gruppen.

Im Vergleich der zwei Gruppen zeigte sich in der VASOSHIELD-Gruppe eine besser erhaltene Endothelzellschicht (Median: CD31-Anteil in Prozent des Gesamtlumens; VASOSHIELD: 60,95%, $n = 40$ vs. konventionell: 54,91%, $n = 43$). Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p = 0,225$). Zudem zeigt sich bei konventioneller Entnahme eine deutlich größere Spannweite (Minimum bis Maximum).

Wie im Boxplot in Abbildung 13 zu erkennen ist, zeigt die konventionelle Entnahme eine deutlich größere Spannweite der Werte mit extrem geringem CD31-Anteil (Minimum 1,5 %) und extrem hohem CD31-Anteil (Maximum 89,9 %). Die Standardabweichung war mit 23,31% bei konventioneller Entnahme ebenfalls größer (vs. 19,74% bei VASOSHIELD).

Ebenso kann anhand des Boxplots bei konventioneller Entnahme ein deutlich größeres 25% - 75%-Quartil, sowie ein sehr großes 25-50%-Quartil und eine große Spannweite vom Minimum bis zum Median abgelesen werden. Dies deutet auf ein gehäuftes Aufkommen von Proben mit einem geringen CD31-positiven Endothelanteil von unter 50% hin. Mittels Vierfeldertafel konnte dies bestätigt werden.

Bei konventioneller Entnahme treten im Vergleich zur VASOSHIELD-Gruppe deutlich mehr Proben mit weniger als 50% CD31-Anteil auf (konventionell: $n = 20$, VASOSHIELD: $n = 11$). Dies entspricht in Bezug auf alle Proben einer Gruppe bei konventioneller Entnahme nahezu der Hälfte aller VSM (konventionell 46,51% vs. VASOSHIELD 27,5%). Dieser Unterschied blieb statistisch ohne Signifikanz, jedoch mit deutlicher Tendenz für eine vermehrte Endothelschädigung über 50% bei konventioneller Entnahmetechnik ($p = 0,074$, $n = 83$).

Die folgende Abbildung zeigt die Verteilung der Proben innerhalb der Gruppen mit mehr oder weniger als 50% CD31-positivem Endothelanteil.

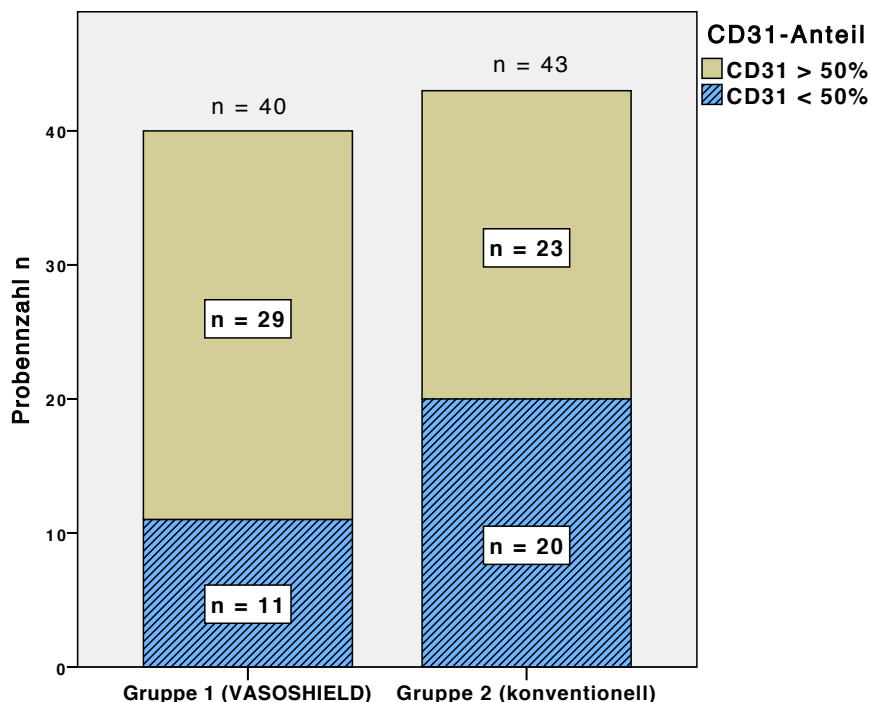


Abbildung 14: Probenverteilung je Gruppe mit mehr oder weniger als 50% Endothelschädigung.

Die Abbildung zeigt die Anzahl der Proben jeder Gruppe mit weniger (blau schraffiert) oder mehr (beige) als 50% CD31-positivem Endothelanteil. Bei konventioneller Entnahme traten im Vergleich zur VASOSHIELD-Gruppe mehr Proben mit einem Endothelschaden von >50% auf (n = 20 vs. n = 11, blaue Balken). Bezogen auf die Gesamtzahl der VSM in jeder Gruppe entspricht dies bei konventioneller Entnahme mit 46,5% knapp der Hälfte aller untersuchten Proben, während in der VASOSHIELD-Gruppe lediglich in 27,5% weniger als 50% CD31 angefärbt wurde. Dieser Unterschied war statistisch ohne Signifikanz, jedoch mit deutlicher Tendenz (p = 0,074).

Bei Ausmessung der Lumenstrecke fielen nebenbefundlich ebenfalls Unterschiede auf. Diese Unterschiede, möglicherweise als Folge der Dehnung nach Spülen mit hohem Druck, ergaben im Durchschnitt ein größeres Lumen bei konventioneller Entnahme (Angabe in mm; konventionell: $7,576 \pm 0,276$, n = 43 vs. VASOSHIELD: $7,021 \pm 0,297$, n = 40). Die Differenz der Lumenstrecke war statistisch jedoch nicht signifikant (p = 0,174).

3.2 Adhäsionsmoleküle

Wie in Kapitel 1.2.1 bereits beschrieben spielen Adhäsionsmoleküle der Immunoglobulin Superfamilie wie ICAM-1, VCAM-1 und P-Selectin eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der VGD. Als Folge einer Stressreaktion werden sie rasch hochreguliert und auf aktivierten Endothelzellen exprimiert, wo sie zu einer Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten führen.

3.2.1 Intercellular adhesion molecule 1

ICAM-1 ist ein transmembranes Protein, welches in niedriger Konzentration durchweg auf Endothelzellen präsent ist. Nach Stimulation kann es hochreguliert werden und wirkt über die Bindung und Transmigration von Leukozyten proinflammatorisch.

3.2.1.1 Immunfluoreszenzhistochemie für ICAM-1

Es wurden probeweise immunfluoreszenzhistochemische Färbungen für ICAM-1 entsprechend dem Protokoll in Kapitel 2.6.4.1 durchgeführt.

Bei Betrachtung der Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop waren die Schnitte positiv bezüglich des Antikörpers gegen ICAM-1. Es zeigten sich jedoch nur sehr geringe Mengen des angefärbten Targets auf dem Endothel, sodass eine objektive Auswertung durch Abmessung der angefärbten Endothelstrecke entsprechend dem Vorgehen für CD31 nicht durchführbar war. Da die fluoreszierenden Antikörper für ICAM-1 nicht immer mit Kernen von Endothelzellen übereinstimmten, war eine Abzählung der angefärbten Endothelzellen zur Quantifizierung von ICAM-1 nicht sinnvoll.

In Abbildung 15 sind beispielhaft fluoreszierende Färbungen des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (rot) auf dem Endothel in Relation zu den Zellkernen (blau) dargestellt. In Bild C sind beispielhaft Endothelzellen markiert (weißer Pfeil), welche offensichtlich kein ICAM-1 exprimieren, während in Bild B der rot fluoreszierende Antikörper für ICAM-1 markiert ist (weißer Kreis).

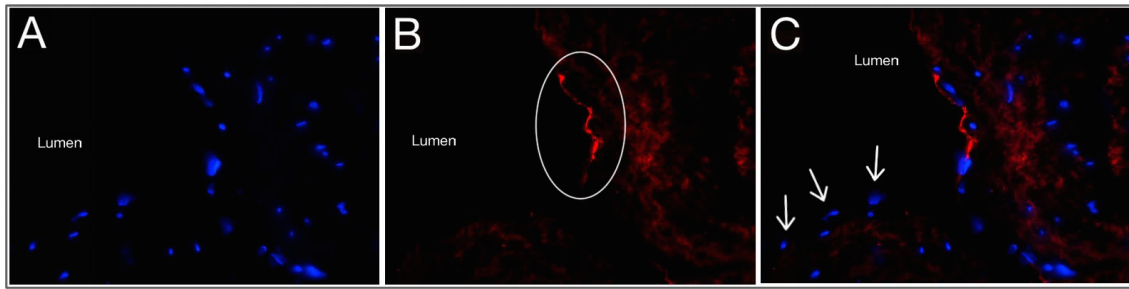


Abbildung 15: Immfluoreszenzhistochemie des Adhäsionsmoleküls ICAM-1.

Bild A: Zellkerne mit DAPI-Färbung (4',6'-Diamidin-2-phenylindol). Bild B: Fluoreszenzfärbung des Moleküls ICAM-1 (rot). Der weiße Kreis zeigt beispielhaft fluoreszierende Antikörper gegen ICAM-1. Bild C: Overlay aus DAPI und Target. Die weißen Pfeile (→) zeigen Zellkerne von Endothelzellen ohne Expression von ICAM-1. Bilder in 63-facher Vergrößerung.

3.2.1.2 Quantitative Real-Time PCR für ICAM-1

Nachdem eine Quantifizierung der Adhäsionsmoleküle histochemisch nicht möglich war, wurde eine weitere molekularbiologische Untersuchung mittels Real-Time PCR durchgeführt (siehe Kapitel 2.7.1). Aufgrund einiger kurzer VSM-Proben konnte nicht für alle Proben genügend Material für die PCR gewonnen werden, sodass letztendlich insgesamt $n = 58$ Proben (konventionell: $n = 26$, VASOSHIELD: $n = 32$) zur Analyse mittels qRT-PCR eingeschlossen werden.

Beim Vergleich der Ergebnisse für ICAM-1 zeigte sich eine verstärkte Expression von ICAM-1 bei konventioneller Entnahme (konventionell: $0,9753 \pm 0,0069$, $n = 32$ vs. VASOSHIELD: $0,9075 \pm 0,0350$, $n = 26$). Dieser Unterschied war statistisch hochsignifikant ($U = 208$, $Z = -3,252$, $p = 0,001$, $n = 58$).

In Abbildung 16 sind die Ergebnisse der RT-PCR für ICAM-1 nochmals als Boxplot dargestellt.

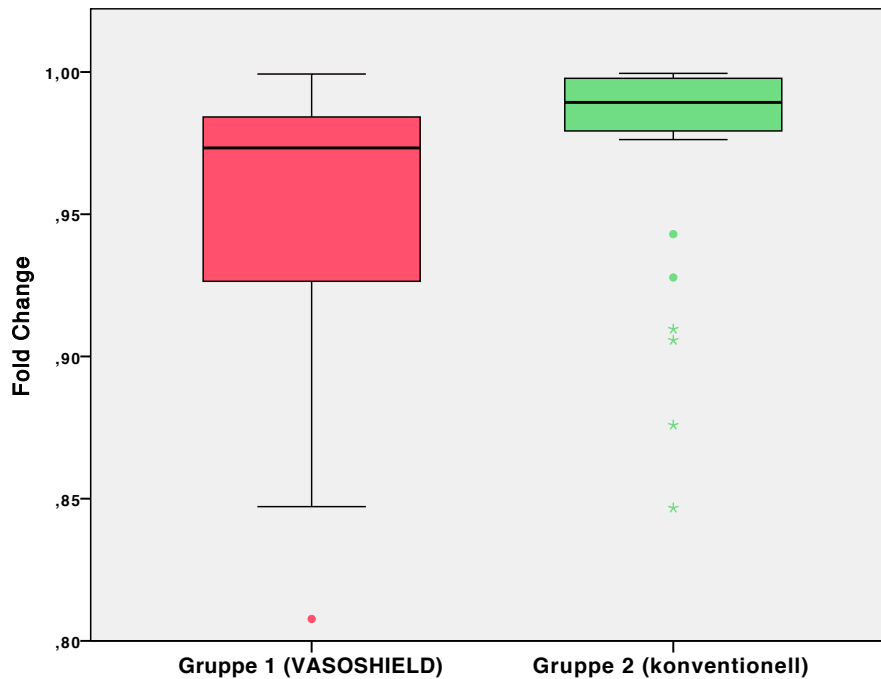


Abbildung 16: Boxplot mit dem Fold Change von ICAM-1 in der qRT-PCR.

Es zeigt sich eine verstärkte Expression von ICAM-1 bei konventioneller Entnahme im Vergleich zur VASOSHIELD-Spritze (Median: VASOSHIELD 0,9733 vs. konventionell 0,9901). Dieser Unterschied war statistisch hochsignifikant ($p = 0,001$). In der VASOSHIELD-Gruppe zeigt sich zudem eine größere Spannweite (Minimum bis Maximum) des Fold Change.

3.2.1.3 Western-Blot für ICAM-1

Wie auch für die RT-PCR konnte nicht für alle 84 Proben ein Western-Blot durchgeführt werden, sodass insgesamt $n = 40$ Proben zur semiquantitativen Analyse mittels Western-Blot eingeschlossen werden konnten. (VASOSHIELD: $n = 20$ Proben, konventionell: $n = 20$ Proben).

In Abbildung 17 sind beispielhaft die Proteinbanden für ICAM-1 (85 – 110 kDa, obere Zeile) und das Normalisierungsprotein GAPDH (37 kDa, untere Zeile) im Western-Blot dargestellt.

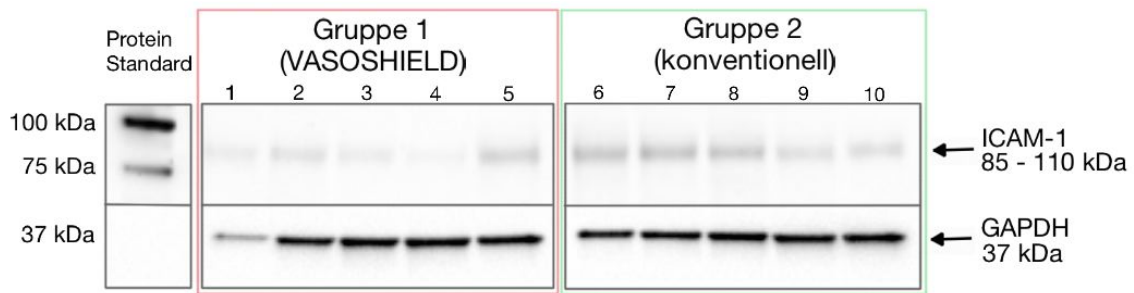


Abbildung 17: Western-Blot für ICAM-1.

Beispielhaft sind hier Proteinbanden für ICAM-1 (Proteinmasse 85-110 kDa, hier ca. 85 kDa) und GAPDH (Housekeeping-Protein, Proteinmasse 37 kDa) im Western-Bot gezeigt.

Banden 1 - 5: Gruppe 1, Banden 6 - 10: Gruppe 2. Es zeigen sich unterschiedliche Mengen an GAPDH (vorallem Bande 1 enthält wenig GAPDH). Im Vergleich der zwei Gruppen scheinen in Gruppe 2 die Proteinbanden für ICAM-1 (vorallem in Spalte 6, 7 und 8) deutlich stärker ausgeprägt.

Belichtungszeit 100 Sekunden. kDa = Kilodalton (Molekülmasse),

Im hier dargestellten Western-Blot lässt sich die unterschiedliche Intensität der ICAM-1 Banden erkennen. Während in der konventionellen Gruppe die Spalten 6, 7 und 8 am dunkelsten erscheinen und somit mutmaßlich am meisten ICAM-1 enthalten, sind in der VASOSHIELD-Gruppe vor allem in Spalte 1 bis 4 nahezu keine Banden erkennbar. Hierbei muss jedoch die Normalisierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH beachtet werden. So ist in Spalte 1 die Bande für GAPDH deutlich schwächer als in den restlichen Spalten. In Bezug auf die geringe GAPDH-Menge in Probe 1 steigt die relativ gemessene Intensität an ICAM-1 somit an.

Nach Intensitätsmessung und Normalisierung aller 40 Proben konnte eine verstärkte Expression von ICAM-1 bei konventioneller Entnahme gemessen werden (Angabe in AU; konventionell: $20,7650 \pm 9,2497$, $n = 20$ vs. VASOSHIELD: $9,9308 \pm 1,8700$, $n = 20$). Dieser Unterschied war statistisch jedoch nicht signifikant ($U = 155$, $Z = -1,217$, $p = 0,224$, $n = 40$).

In Abbildung 18 sind die Intensitäten des Western-Blots für ICAM-1 in einem Boxplot veranschaulicht.

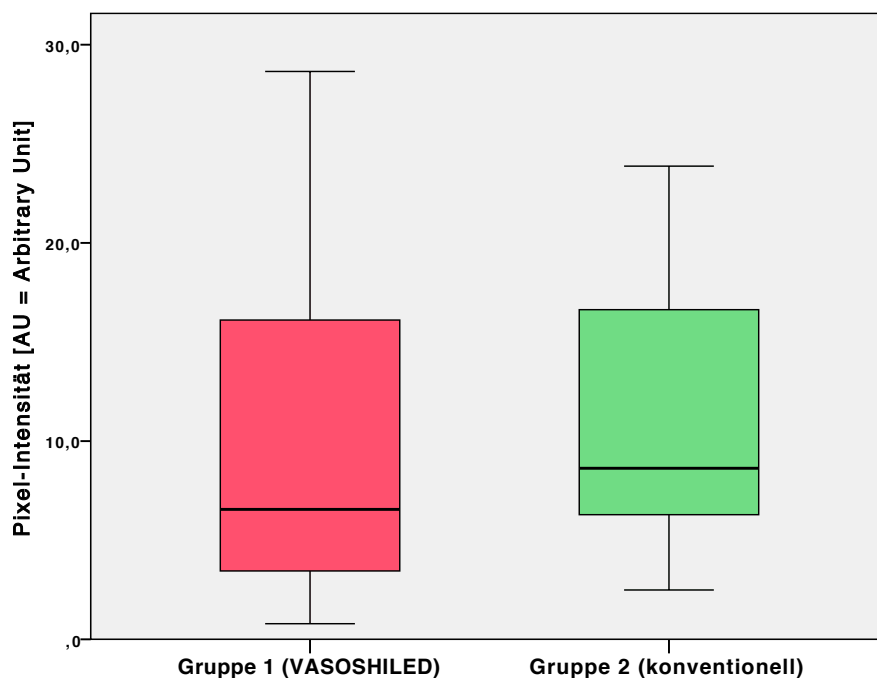


Abbildung 18: Boxplot mit ICAM-1 Pixelintensität im Western-Blot

Der Boxplot zeigt die gemessene Pixelintensitäten für ICAM-1 der zwei Gruppen. Anhand des Medians zeigt sich, dass bei konventioneller Entnahme etwas mehr ICAM-1 exprimiert wird (Median: Angabe in AU; konventionell: 8,6299 vs. VASOSHIELD: 6,5555). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,224$). In der VASOSHIELD-Gruppe zeigt sich zudem eine größere Spannweite (Minimum bis Maximum). AU = Arbitrary Unit.

3.2.2 Vascular cell adhesion molecule 1

VCAM-1 ist wie ICAM-1 ein Adhäsionsmolekül auf Endothelzellen, welches nach einer Stressreaktion hochreguliert wird und ebenfalls zur Bindung von Leukozyten auf den Endothelzellen führt.

3.2.2.1 Immunfluoreszenzhistochemie für VCAM-1

In dieser Arbeit konnte VCAM-1 auf Endothelzellen immunfluoreszenzhistochemisch nicht nachgewiesen werden. Dieser Umstand konnte so bereits in früheren Studien beschrieben werden. Die weitere Untersuchung von VCAM-1 erfolgte schließlich mittels qRT-PCR.

3.2.2.2 Quantitative Real-Time PCR für VCAM-1

Es konnten insgesamt $n = 58$ Proben (VASOSHIELD: $n = 26$, konventionell: $n = 32$) mittels qRT-PCR auf den Marker VCAM-1 untersucht werden.

Mittels RT-PCR ließ sich eine verstärkte Expression von VCAM-1 bei konventioneller Entnahme nachweisen (konventionell: $0,9056 \pm 0,0188$, $n = 33$ vs. VASOSHIELD: $0,8161 \pm 0,0315$, $n = 26$). Der Median zeigte die gleiche Tendenz (konventionell: $0,9519$ vs. VASOSHIELD: $0,8447$). Dieser Unterschied war statistisch sehr signifikant ($U = 233$, $Z = -2,861$, $p = 0,004$, $n = 58$).

In Abbildung 19 sind die Fold Change der RT-PCR für VCAM-1 als Boxplot dargestellt.

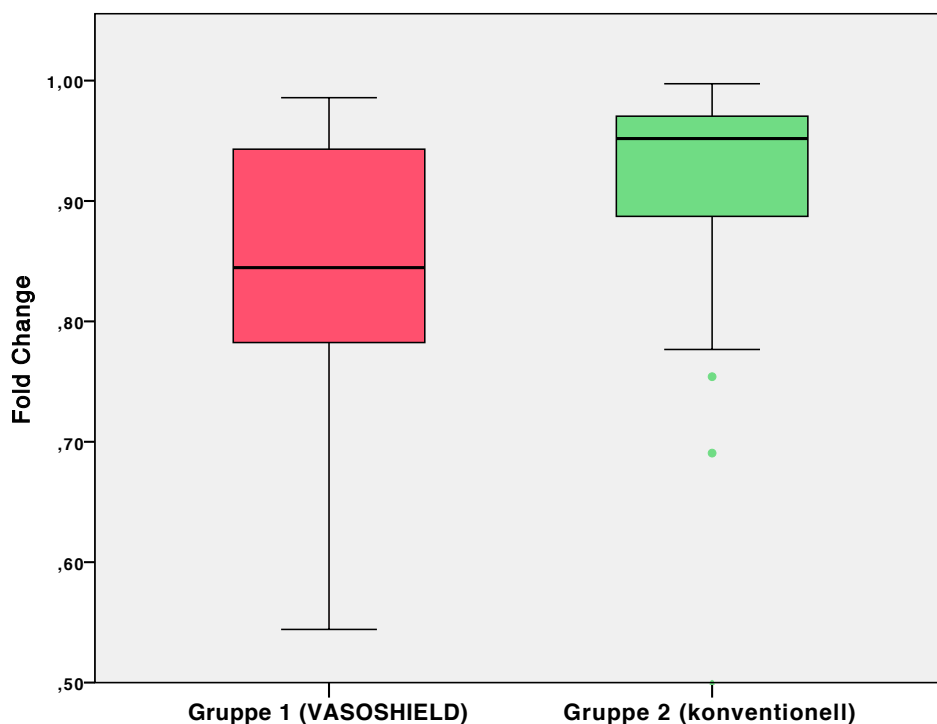


Abbildung 19: Boxplot mit dem Fold Change von VCAM-1 in der qRT-PCR.

Es zeigt sich ein deutlich verstärktes Vorliegen von VCAM-1 bei konventioneller Entnahme im Vergleich zur VASOSHIELD-Spritze (Median: konventionell $0,9519$ vs. VASOSHIELD $0,8447$). Dieser Unterschied war statistisch sehr signifikant ($p = 0,004$). In der VASOSHIELD-Gruppe zeigt sich zudem eine größere Spannweite (Minimum bis Maximum) des Fold Change.

3.2.2.3 Western-Blot für VCAM-1

Insgesamt lag nur eine geringe Menge an Probenmaterial der VSM zur molekularbiologischen Untersuchung vor. Nachdem VCAM-1 genau wie ICAM-1 zur Bindung von Leukozyten an die Endothelzellen führt und in vorherigen Arbeiten eine geringere Veränderung von VCAM-1 im Vergleich zu ICAM-1 beschrieben wurde, erfolgte zugunsten von ICAM-1 und den anderen Targets keine weitere Analyse von VCAM-1 mittels Western-Blot.

3.2.3 **P-Selectin**

P-Selectin ist wie ICAM-1 und VCAM-1 ein Zelladhäsionsmolekül (cell adhesion molecule, CAM) und wird ebenfalls auf aktivierten Endothelzellen nach Stressreaktion exprimiert.

3.2.3.1 Immunfluoreszenzhistochemie für P-Selectin

In dieser Arbeit konnte P-Selectin immunhistologisch mithilfe von fluoreszierenden Antikörpern nachgewiesen werden (siehe Protokoll Kapitel 2.6.4.1). Wie bereits bei den Färbungen für ICAM-1 war unter dem Fluoreszenzmikroskop lediglich ein sehr geringer Anteil des Endothels für P-Selectin angefärbt. Eine immunhistologische Quantifizierung von P-Selectin war wie schon bei ICAM-1 somit nicht durchführbar.

Abbildung 20 zeigt beispielhaft die Immunfluoreszenz von P-Selectin (rot) entlang des Endothels einer VSM. In Bild B sind rot fluoreszierend die Antikörper für P-Selectin auf den Endothelzellen zu sehen (weiße Pfeile).

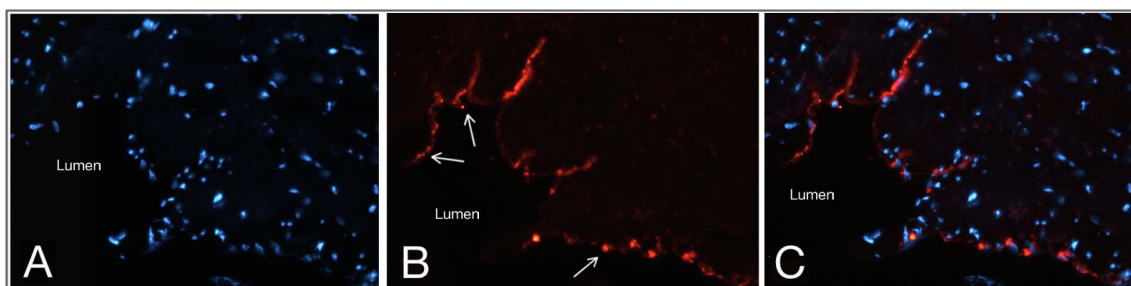


Abbildung 20: Immunfluoreszenzhistochemie der Targets P-Selectin.

Bild A: Zellkerne mit DAPI-Färbung (4',6'-Diamidin-2-phenylindol). Bild B: Fluoreszenzfärbung des ausgewählten Targets P-Selectin (rot) auf Endothelzellen, die weißen Pfeile (→) zeigen beispielhaft fluoreszierende Antikörper gegen P-Selectin. Bild C: Overlay aus DAPI und Target. Bilder in 40-facher Vergrößerung.

3.2.3.2 Quantitative Real-Time PCR für P-Selectin

Es konnten insgesamt $n = 58$ Proben (VASOSHIELD: $n = 26$, konventionell: $n = 32$) zur qRT-PCR-Analyse auf P-Selectin eingeschlossen werden.

Die Ergebnisse der RT-PCR ergaben eine leicht erhöhten Fold Change von P-Selectin in der VASOSHIELD-Gruppe (VASOSHIELD: $0,7555 \pm 0,0302$, $n = 26$ vs. konventionell: $0,7294 \pm 0,0340$, $n = 32$). Der Median zeigte die gleichen Tendenz (VASOSHIELD: $0,7927$ vs. konventionell: $0,7761$). Dieser Unterschied des Fold Change für P-Selectin war statistisch nicht signifikant ($U = 399$, $Z = -0,266$, $p = 0,790$, $n = 58$).

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse der RT-PCR für P-Selectin nochmals als Boxplot dargestellt.

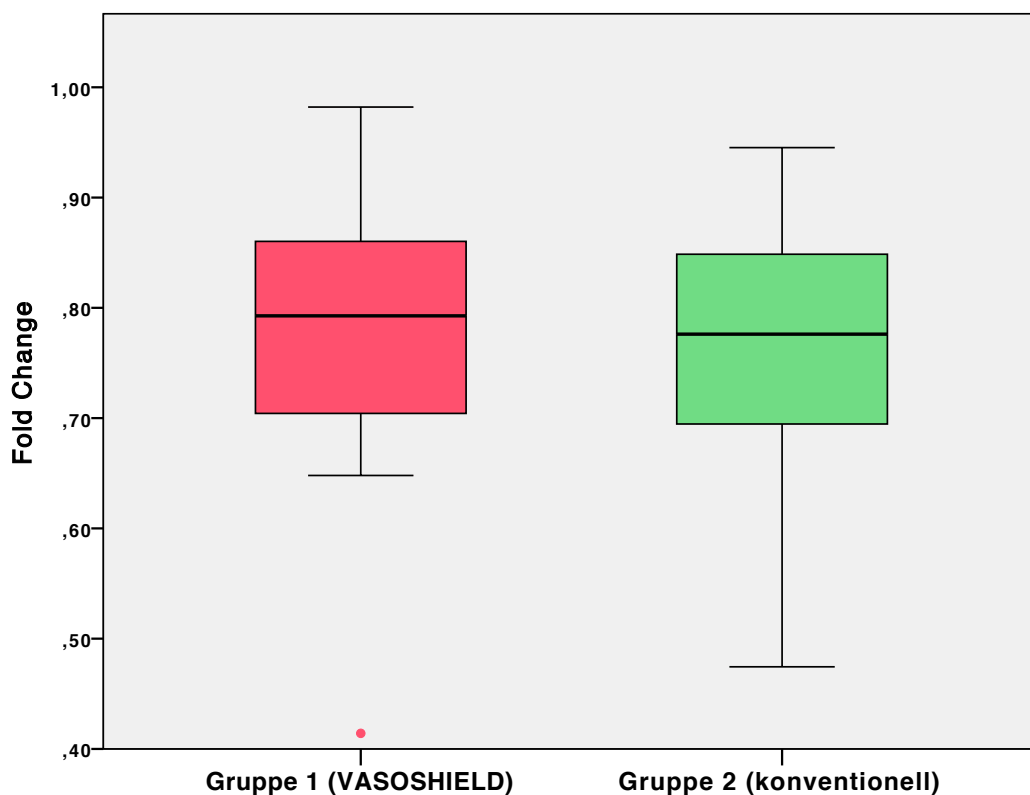


Abbildung 21: Boxplot mit dem Fold Change von P-Selectin in der qRT-PCR.

Es zeigt sich in beiden Gruppen ein nahezu identischer Fold Change (Median: VASOSHIELD $0,7927$ vs. konventionell: $0,7761$). Der Unterschied im Fold Change für P-Selectin ist statistisch nicht signifikant ($p = 0,790$). Bei konventioneller Entnahme zeigt sich eine größere Spannweite der Werte (Minimum bis Maximum).

3.2.3.3 Western-Blot für P-Selectin

Zur Analyse mittels Western-Blot konnten insgesamt $n = 64$ Proben eingeschlossen werden (VASOSHIELD: $n = 32$ Proben, konventionell: $n = 32$ Proben).

In Abbildung 22 sind beispielhaft die Proteinbanden für P-Selectin (140 kDa, obere Zeile) und das Normalisierungsprotein GAPDH (37 kDa, untere Zeile) im Western-Blot dargestellt.

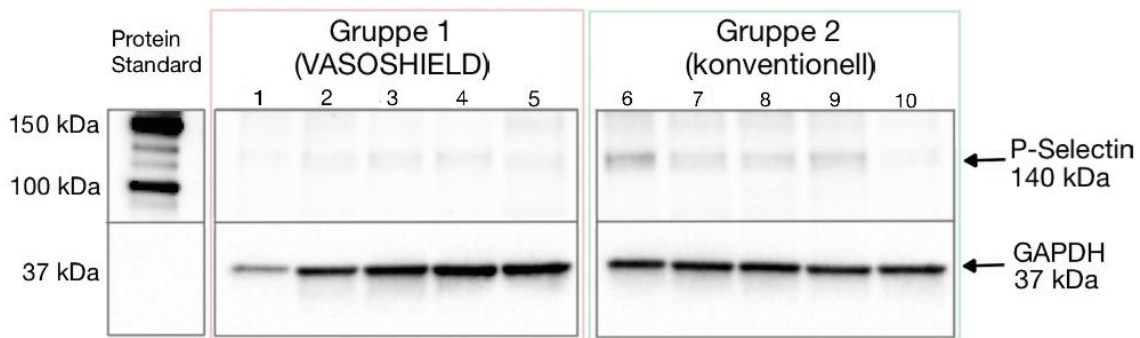


Abbildung 22: Western-Blot für P-Selectin.

Beispielhaft sind hier Proteinbanden für P-Selectin (Proteinmasse 140 kDa) und GAPDH (Housekeeping-Protein, Proteinmasse 37 kDa) im Western-Bot gezeigt. Banden 1 - 5: Gruppe 1, Banden 6 - 10: Gruppe 2. Es zeigen sich unterschiedliche Mengen an GAPDH (vor allem Bande 1 enthält wenig GAPDH). Im Vergleich der zwei Gruppen scheinen in Gruppe 2 die Proteinbanden für P-Selectin (vor allem in Spalte 6) stärker ausgeprägt. kDa = Kilodalton (Molekülmasse), Belichtungszeit 300 Sekunden.

Im dargestellten Western-Blot für P-Selectin lässt sich die unterschiedliche Intensität der Bande erkennen. Im Vergleich der zwei Gruppen scheinen die Banden bei konventioneller Entnahme dunkler (vorallem Spalte 6). In der VASOSHIELD-Gruppe sind die Banden für P-Selectin alle sehr schwach ausgeprägt. Weiterhin ist erkennbar, dass Probe 1 vergleichsweise wenig GAPDH enthält, was die Menge an P-Selectin hierauf hierauf bezogen relativ ansteigen lässt.

Die Messung der Intensitäten ergab bei konventioneller Entnahme eine verstärkte Expression von P-Selectin (Angabe in AU; konventionell: $7,6993 \pm 1,5566$, $n = 32$ vs. VASOSHIELD: $7,5738 \pm 1,0930$, $n = 32$). Dieser Unterschied für P-Selectin war jedoch statistisch nicht signifikant ($U = 488$, $Z = -0,322$, $p = 0,747$, $n = 64$).

Die Ergebnisse der Intensitäten von P-Selectin im Western-Blot sind in Abbildung 23 als Boxplot dargestellt.

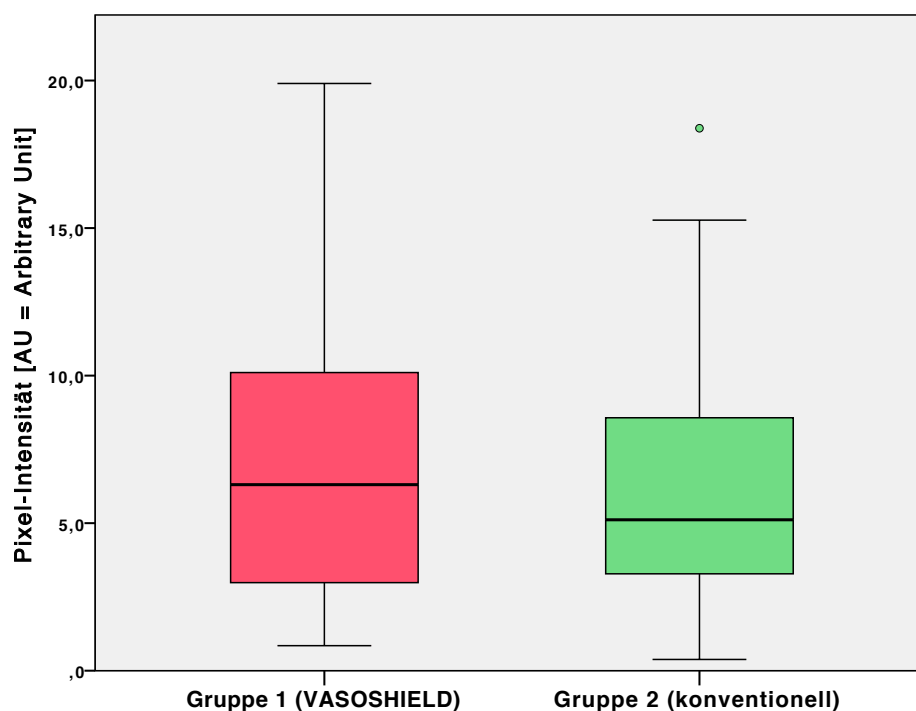


Abbildung 23: Boxplot mit P-Selectin Pixelintensität im Western-Blot

Der Boxplot zeigt die gemessene Pixelintensitäten für P-Selectin der zwei Gruppen. Der gemessene Unterschied der Pixel-Intensität war jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,747$). In der VASOSHIELD-Gruppe zeigt sich zudem eine größere Spannweite der Messwerte (Minimum bis Maximum). AU = Arbitrary Unit.

3.3 Stickstoffmonoxid (NO)

Wie in Kapitel 1.2.1 und Kapitel 1.2.2 beschrieben spielt NO als vasoprotektiver Faktor und Regulator der kardiovaskulären Homöostase eine entscheidene Rolle bei den Prozessen der VGD.

3.3.1 Endotheliale NO-Synthase

Aufgrund seiner sehr kurzen Halbwertszeit ist NO instabil und muss ständig neu synthetisiert werden. Dies geschieht in der VSM über die endotheliale NO-Synthase.

3.3.1.1 Immunfluoreszenzhistochemie für eNOS

Entsprechend dem Vorgehen für ICAM-1 und P-Selectin erfolgte die immunfluoreszenzhistochemische Anfärbung von eNOS.

Die Schnitte waren unter dem Fluoreszenzmikroskop positiv für eNOS. Wie bereits bei ICAM-1 und P-Selectin waren jedoch erneut nur sehr geringe Anteile des Endothels der VSM angefärbt, sodass eine Quantifizierung der eNOS-Menge nicht möglich war.

In Abbildung 24 ist beispielhaft eine Färbung von eNOS (rot) in Relation zu den Zellkernen (blau) dargestellt. In Bild B sind die rot fluoreszierenden Antikörper gegen eNOS dargestellt (weißer Kreis), während teilweise auch Endothel ohne eNOS-Markierung zu sehen ist (weiße Pfeile).

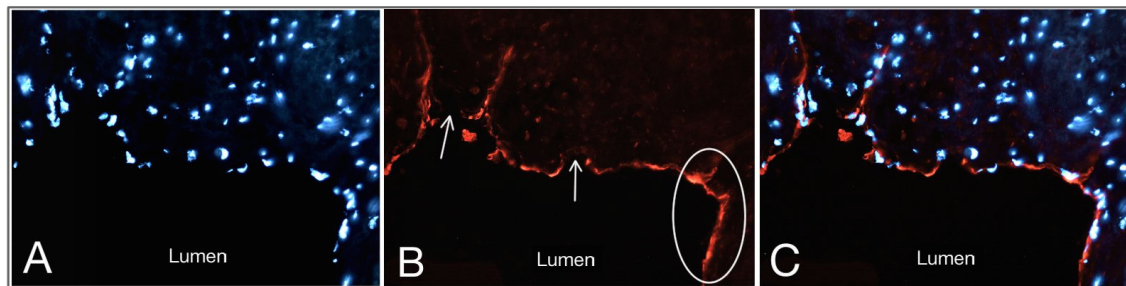


Abbildung 24: Immunfluoreszenzhistochemie der Targets eNOS.

Bild A: Zellkerne mit DAPI-Färbung (4',6'-Diamidin-2-phenylindol). Bild B: Fluoreszenzfärbung des ausgewählten Targets eNOS (rot) auf Endothelzellen, die weißen Pfeile (→) zeigen beispielhaft den Bereich **ohne** eNOS. Bild C: Overlay aus DAPI und Target. Bilder in 40-facher Vergrößerung.

3.3.1.2 Quantitative Real-Time PCR für eNOS

Es konnten insgesamt n = 58 Proben (VASOSHIELD: n = 26, konventionell: n = 32) mittels qRT-PCR auf das Target eNOS untersucht werden.

Die Auswertung der PCR ergab eine leicht verstärkte Expression von eNOS in der VASOSHIELD-Gruppe (VASOSHIELD: $0,6445 \pm 0,0352$, n = 26, vs. konventionell: $0,6342 \pm 0,0322$, n = 32). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (U = 408, Z = - 0,125, p = 0,900, n = 58).

In Abbildung 25 sind die Ergebnisse der qRT-PCR für eNOS in einem Boxplot graphisch dargestellt.

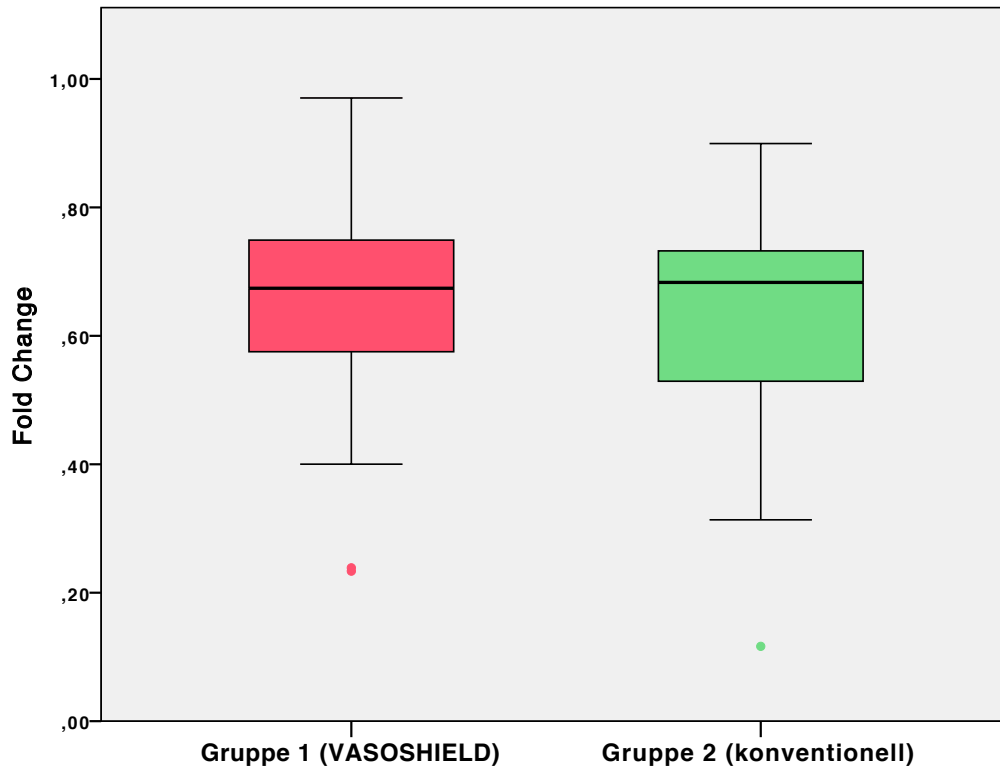


Abbildung 25: Boxplot mit dem Fold Change von eNOS in der qRT-PCR.

Der Boxplot zeigt den errechneten Fold Change für eNOS der zwei Gruppen. Insgesamt zeigt sich eine leicht verstärkte Expression von eNOS in der VASOSHIELD-Gruppe, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p = 0,900$).

3.3.1.3 Western-Blot für eNOS

Für die semiquantitative Analyse mittels Western-Blot konnten insgesamt $n = 64$ Proben (VASOSHIELD: $n = 32$, konventionell: $n = 32$) eingeschlossen werden.

In Abbildung 26 ist beispielhaft die Proteinbanden für eNOS (133 kDa, obere Zeile) und das Housekeeping-Gen GAPD (37 kDa, untere Zeile) im Vergleich beider Gruppen dargestellt.

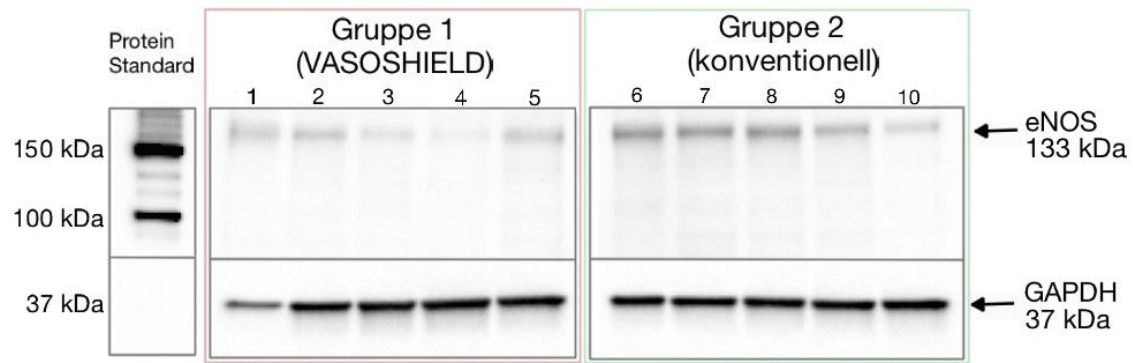


Abbildung 26: Western-Blot für eNOS.

Beispielhaft sind hier Proteinbanden für eNOS (Proteinmasse 133kDa, hier ca. 160kDa) und GAPDH (Housekeeping-Protein, Proteinmasse 37 kDa) im Western-Bot gezeigt.

Banden 1 - 5: Gruppe 1, Banden 6 - 10: Gruppe 2. Es zeigen sich unterschiedliche Mengen an GAPDH (vor allem Bande 1 enthält wenig GAPDH). Im Vergleich der zwei Gruppen scheinen in Gruppe 2 die Proteinbanden für eNOS (vor allem in Spalte 6 bis 9) stärker ausgeprägt. kDa = Kilodalton (Molekülmasse), Belichtungszeit 100 Sekunden.

In obiger Abbildung sind unterschiedliche Intensitäten der Banden und somit auch unterschiedliche Mengen an eNOs zu sehen. In Spalte 6 bis 9 ist die Bande deutlich dunkler als in den anderen Proben, sodass hier eine erhöhte eNOS-Menge zu erwarten ist.

Der Vergleich der Bandenintensitäten ergab eine minimal verstärkte eNOS-Expression bei konventioneller Entnahme (Angabe in AU; konventionell: $17,8665 \pm 2,2409$, $n = 32$ vs. VASOSHIELD: $16,5513 \pm 1,9291$, $n = 32$). Dieser Unterschied der eNOS-Expression war statistisch nicht signifikant ($U = 493$, $Z = -0,255$, $p = 0,799$, $n = 64$).

Die Ergebnisse für eNOS im Western-Blot sind in Abbildung 27 nochmals als Boxplot graphisch dargestellt. Es ist eine deutlich weitere Spannweite (Minimum bis Maximum) der Werte bei konventioneller Entnahme zu sehen.

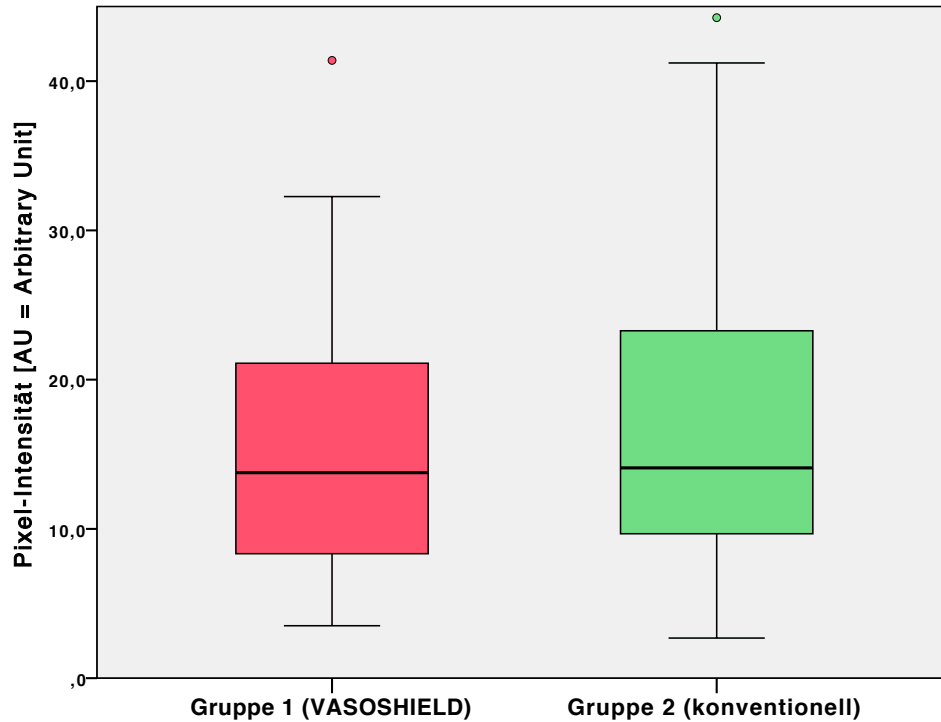


Abbildung 27: Boxplot mit eNOS Pixelintensität im Western-Blot

Der Boxplot zeigt die gemessene Pixelintensitäten für eNOS der zwei Gruppen. Anhand des Medians zeigt sich, dass bei konventioneller Entnahme etwas mehr eNOS exprimiert wurde (Angabe in AU; Gruppe 1: Median 13,7665 vs. Gruppe 2: 14,0878). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,799$). Bei konventioneller Entnahme zeigt sich zudem eine größere Spannweite (Minimum bis Maximum). AU = Arbitrary Unit

3.4 Vergleich der qRT-PCR Ergebnisse

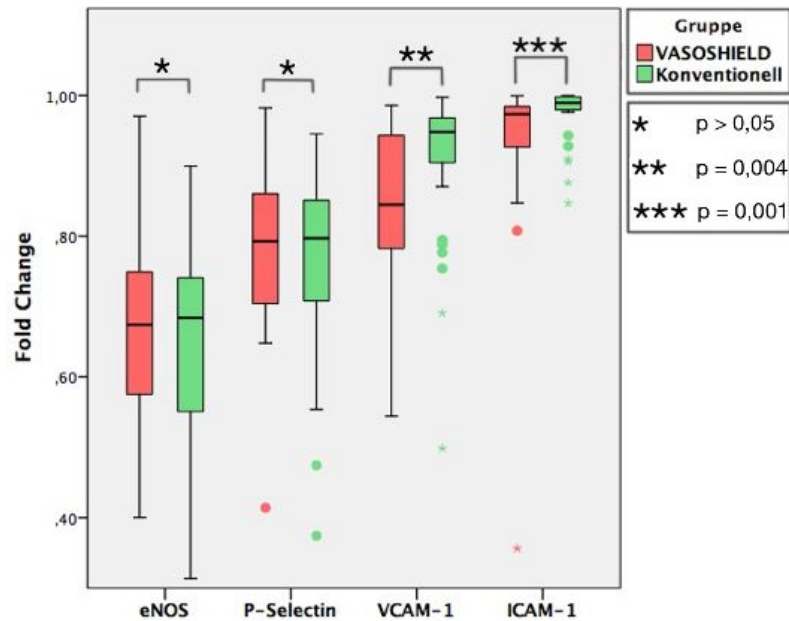


Abbildung 28: Boxplot aller Targets in der qRT-PCR nach Gruppen.

Es zeigen sich deutliche Unterschiede im Fold Change der unterschiedlichen Targets zueinander. Für die Targets eNOS und P-Selectin sind keine relevanten Unterschiede in beiden Gruppen erkennbar. Bei VCAM-1 und ICAM-1 zeigt sich bei konventioneller Entnahme jeweils mehr Adhäsionsmolekül als bei Entnahme mittels VASOSHIELD-Spritze. Statistische Signifikanz der Unterschiede: * p > 0,05; ** p = 0,004; *** p = 0,0001.

3.5 Vergleich der WB Ergebnisse

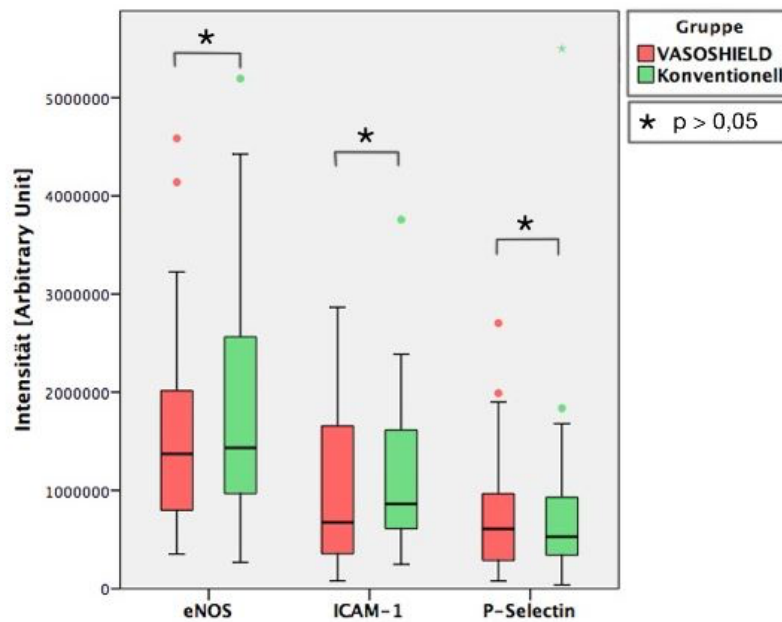


Abbildung 29: Boxplot aller Targets im Western-Blot nach Gruppen.

Es zeigen sich leichte Unterschiede der Targets eNOS, ICAM-1 und P-Selectin. Alle Targets sind bei konventioneller Entnahme leicht verstärkt messbar, jedoch ohne statistische Signifikanz (* p > 0,05).

4 DISKUSSION UND AUSBLICK

4.1 Versuchsaufbau und Methodik

In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um die erste prospektive randomisierte Studie, welche den Einfluss des Spüldrucks bei Entnahme von humanen VSM auf die Gefäßqualität untersucht.

In den bisher durchgeführten Studien wurde zumeist der Einfluss eines fixen Spüldrucks (z.B. 100 mmHg, 200 mmH oder 300 mmHg) über eine willkürlich festgelegte Zeitspanne (z.B. 15 Sekunden, 1 Minute oder 2 Minuten) auf die Qualität der VSM untersucht. In der hier vorliegenden Arbeit wurde jedoch die heute als Standard geltende Entnahmemethode mittels konventioneller Spritze mit der Entnahme mittels einer drucklimitierenden Spritze im klinischen Alltag verglichen. Andere Einflussfaktoren auf die Gefäßqualität, wie z.B. die intraoperative Entnahmetechnik, wurden in beiden Gruppen entsprechend gleich durchgeführt, um den Einfluss auf die Gefäßqualität zu minimieren.

Die Verarbeitung der Proben, Durchführung der Experimente und spätere Auswertung erfolgten verblindet. Die Methodik mittels Immunhistologie, qRT-PCR und Western-Blot gilt heute als Standardmethodik zur Analyse quantitativer Unterschiede bestimmter Targets. Durch Anfertigung mehreren histologischer Schnitte aus unterschiedlichen Abschnitten der VSM konnten mögliche Extremwerte in der Endothelschädigung ausgeglichen werden. Das Probenmaterial für die qRT-PCR und den Western-Blot wurde ebenfalls aus verschiedenen Abschnitten der VSM-Stücke gewonnen, um auch hier mögliche Extremwerte zu vermeiden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Endothelintegrität

Bereits 1976 konnten Ramos et al. den schädigenden Einfluss des Spüldrucks auf die Endothelzellen von venösen Gefäßen nachweisen (Ramos et al., 1976). Hofer et al. bestätigten diese Ergebnisse und identifizierten die Dehnung der venösen Gefäße als wichtigsten Einflussfaktor für die Verletzung der VSM (Hofer et al., 1981). Sie konnten zeigen, dass nach konventioneller Entnahme der VSM deutliche Endothelveränderungen wie Schwellung und Verlust von Endothelzellen sowie Risse im Endothel auftraten. Unter Drucklimitierung auf 100-120 mmHg ließ sich eine deutlich bessere Endothelintegrität im Vergleich zur Entnahme ohne Druckkontrolle nachweisen (Hasse et al., 1981).

Mit zunehmendem Verständnis über die Prozesse der VGD konnte eine Korrelation von Endothelschäden und dem frühen Transplantatversagen durch Thrombosierung ausgemacht werden (Manchio et al., 2005)(Sasaki et al., 2000). Khaleel und Kollegen konnten bereits zeigen, dass die Endothelintegrität signifikant von der Höhe des durchschnittlichen Spüldrucks sowie der Dauer des Spülens abhängt (Khaleel et al., 2012). Hieraus ergab sich der Ansatz, durch veränderte Prozesse bei der Entnahme der VSM eine Schädigung des Gefäßes zu reduzieren (Dashwood and Loesch, 2007). Aufgrund des direkt schädigenden Einflusses des Spüldrucks auf die Endothelintegrität scheint der einfachste und effektivste Weg zur Verbesserung der Bypassqualität somit die Reduktion des Spüldrucks der VSM (z.B. mittels VASOSHIELD-Spritze) zu sein (McCready, 2013).

In dieser Arbeit konnten bereits in der ersten subjektiven Beurteilung der HE-Färbungen deutliche Unterschiede in der Gefäßstruktur und Endothelintegrität festgestellt werden. Es zeigten sich zum Teil deutliche Risse im Endothel und häufig waren große Teile des Endothels abgetragen.

Zur genaueren Evaluation des Endothels wurde der Marker CD31 ausgewählt. CD31 ist ein Adhäsionsmolekül der Immunglobulin Superfamilie und wird vor allem auf Endothelzellen exprimiert und ist dort bei der Zell-Zell-Interaktion sowie der Transmigration von Leukozyten beteiligt (Muller et al., 1993)(Jang et al., 1994). Aufgrund des ubiquitären Vorkommens und seiner konstitutiven Expression auf Endothelzellen dient CD31 in der Immunhistochemie als Standardmethode zum Nachweis von Endothelzellen (Kriegelstein and Granger, 2001)(Ilán and Madri, 2003).

Die absoluten Ergebnisse der CD31-Analyse in der vorliegenden Arbeit ergaben im Mittel einen größeren CD31-positiven Endothelanteil in der VASOSHIELD-Gruppe als Zeichen einer verstärkten Endothelschädigung bei konventioneller Entnahme. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,225$). Bei knapp der Hälfte aller konventionell entnommenen Proben konnte ein CD31-positiver Endothelanteil von $< 50\%$ gemessen werden, während in der VASOSHIELD-Gruppe diese ausgeprägten Endothelschäden deutlich seltener auftraten. Dieser Unterschied blieb statistisch ohne Signifikanz, jedoch mit deutlicher Tendenz ($p = 0,074$).

In Studien konnte bei manuellem unkontrolliertem Spülen mit einer herkömmlichen Spritze Spitzendrücke von über 600 mmHg gemessen werden (Hasse et al., 1981). In der Arbeit von Li et al. konnte beispielsweise ein Spitzendruck von 883 mmHg gemessen werden (Li et al., 2014). Zudem wurden in einem verblindeten Versuchsaufbau sehr unterschiedliche Spüldrücke von < 150 mmHg bis > 400 mmHg beim Spülvorgang der VSM gemessen (Khaleel et al., 2012). In weiteren Arbeiten konnte ein direkter Zusammenhang der Höhe des Spüldrucks mit der Ausprägung der Endothelschädigung festgestellt werden. So konnten Chester und Kollegen zeigen, dass beim Spülen mit einem Druck von 300 mmHg im Vergleich zu 100 mmHg deutlich ausgeprägtere Endothelschäden mit vermindertem Nachweis von CD31 auftreten (Chester et al., 1998a). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass in der hier vorliegenden Arbeit die ausgeprägte Schädigung von $> 50\%$ des Endothels durch die erhöhten Spitzendrücke bei konventioneller Entnahme verursacht wurde. Die VASOSHIELD-Spritze hingegen hält den Spüldruck konstant. Auch wenn es bereits bei einem Druck von 250 mmHg zu einer Schädigung der VSM kommt (Ozturk et al., 2013)(Li et al., 2014), so werden doch starke Schwankungen des Spüldrucks sowie Spitzendrücken von über 600 mmHg vermieden und somit eine großflächige Endothelschädigung eher vorgebeugt.

4.2.2 Adhäsionsmoleküle

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten CAMs (cell adhesion molecule) sind ICAM-1, VCAM-1 und P-Selectin. Diese spielen durch Adhäsion von Leukozyten am Endothel eine entscheidende Rolle bei der Inflammation und somit auch bei der VGD.

ICAM-1 ist ein transmembranes Protein, welches in niedriger Konzentration durchweg auf Endothelzellen präsent ist und als Adhäsionsmolekül für Integrine fungiert

(Bella et al., 1998). Durch Ligation mit den passenden Integrinen wirkt ICAM-1 über die Rekrutierung, Bindung und Transmigration von Leukozyten stark proinflammatorisch (Crook et al., 2008). Als Reaktion auf eine Stimulation mit Zytokinen im Rahmen einer Stressreaktion kann die Expression zudem hochreguliert werden (Bella et al., 1998).

VCAM-1 ist ebenfalls auf Endothelzellen zu finden und bindet an Integrine auf Lymphozyten und Monozyten (Jang et al., 1994). Im Gegensatz zu ICAM-1 wird es in Ruhe gar nicht oder nur in sehr geringem Maße auf Endothelzellen exprimiert (Crook et al., 2000). Nach Stimulation mit Zytokinen kann deren Expression jedoch deutlich gesteigert werden, sodass auch hierüber eine feste Adhäsion von Leukozyten auf den Endothelzellen erfolgt (Kriegelstein and Granger, 2001).

P-Selectin gehört zur Gruppe der Selektine und ist wie ICAM-1 und VCAM-1 ein CAM, welches auf aktivierten Endothelzellen exprimiert wird und ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Leukozytenadhäsion spielt (Kriegelstein and Granger, 2001). Aufgrund seiner Speicherform in zytoplasmatischen Granula, den sog. Weibel-Palade-Körperchen (Weibel-Palade bodies, WPB)(Bonfanti et al., 1989)(McEver et al., 1989), kann es nach Stressreaktion besonders rasch exprimiert werden. So konnte ein früher Anstieg von P-Selectin bereits 10 - 30 min nach einer Ischämie detektiert werden, während die maximale Expression, welche am ehesten durch eine gesteigerte Transkription bedingt ist, etwas verzögert erst nach 5 Stunden gemessen wurde (Eppihimer et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte bei beiden Entnahmemethoden lediglich eine sehr geringe Menge der Adhäsionsmoleküle immunhistochemisch nachgewiesen werden, sodass eine Quantifizierung nicht möglich war. Ähnliches zeigten bereits Studien in denen immunhistochemisch ICAM-1 und VCAM-1 immunhistochemisch nur in sehr geringen Mengen detektierbar waren (Chester et al., 1998b)(Chester et al., 1996) (Meroni and Tremoli, 2003)(Crook et al., 2008). Da jedoch eine ausgeprägte Steigerung der Expression nach Stimulation mit Zytokinen nachgewiesen werden konnte (Crook et al., 2000)(Kriegelstein and Granger, 2001), folgte die molekularbiologische Analyse.

Die Untersuchung mittels semi-quantitativem Western-Blot ergab hierbei keinen statistisch signifikanten Unterschied beider Gruppen für P-Selectin und ICAM-1. Für VCAM-1 konnte aufgrund der geringen Mengen an Probenmaterial kein Western-Blot durchgeführt werden.

In der qRT-PCR zeigte sich kein signifikanter Unterschied beider Entnahmemethoden für P-Selectin. ICAM-1 und VCAM-1 zeigten jedoch eine statistisch signifikant erhöhte

Expression bei konventioneller Entnahme (ICAM-1: $p = 0,001$, VCAM-1: $p = 0,004$). Da beide Adhäsionsmoleküle an der VGD beteiligt sind, ist von einer verstärkten Schädigung der VSM bei konventioneller Entnahme auszugehen.

Chello et al untersuchten bei 20 Patienten welche eine CABG mit der VSM erhielten den Einfluss des Spüldrucks (300 mmHg) auf die Expression von Adhäsionsmoleküle. So wurde ICAM-1 relativ gesehen stärker hochreguliert als VCAM-1 (Chello et al., 2003). Die verstärkte Expression von ICAM-1 im Vergleich zu VCAM-1 kann hierdurch bedingt sein, dass ICAM-1 bereits 2 Stunden nach Einfluss von Scherstress messbar hochreguliert wird (Nagel et al., 1994), während die maximale Expression von VCAM verspätet zwischen 6 und 24 Stunden nach Zytokin-Stimulation eintritt (Poher, 2002)(Jang et al., 1994).

Dumanski et al. konnten nach Spülen der VSM mit 300 mmHg eine deutlich gesteigerte Expression sowohl für VCAM-1, ICAM-1 als auch P-Selectin immunhistologische nachweisen (Dumanski et al., 2007). In einer weiteren Studie konnte bereits eine deutliche Steigerung von ICAM-1 bei konventioneller Entnahme und Spülen mit 150 mmHg gezeigt werden (Hinokiyama et al., 2006). Die gleichen Ergebnisse konnten Khaleel und Kollegen erheben. Nach Spülen der VSM konnte im Vergleich zur unbehandelten VSM eine signifikante Steigerung der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 gemessen werden (Khaleel et al., 2012).

Für P-Selectin ließ sich in einer Arbeit von Eppihimer und Kollegen eine zwei bis vierfache Steigerung nach 20-minütiger Ischämie nachweisen (Eppihimer et al., 1997). Die maximale Expression nach Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ trat im Vergleich zu ICAM-1 und VCAM-1 deutlicher früher, nämlich bereits nach vier Stunden auf (Hahne et al., 1993). Chello et al. konnten für P-Selectin im Vergleich zu ICAM-1 und VCAM-1 die stärkste Expressionssteigerung nach Spülen mit 300 mmHg messen (Chello et al., 2003). Dem gegenüber stehen Arbeiten, in welcher sich keine relevante Steigerung von P-Selectin nach Stressreaktion zeigen ließ (Golledge et al., 1997)(Nagel et al., 1994).

Als mögliche Erklärung für den ausbleibenden Unterschied für P-Selectin in beiden Gruppen könnte die hemmende Wirkung von NO auf die Selektine dienen. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von VCAM-1 als auch P-Selektin durch NO deutlich gehemmt wird (Chello et al., 2003)(De Caterina et al., 1995). Da in der hier vorliegenden Arbeit keine Reduktion der eNOS bei konventioneller Entnahme festgestellt werden konnte, kann argumentiert werden, dass durch die NO bei konventioneller Entnahme eine starke Hemmung der Expression von P-Selektin stattfand und deshalb keine signifikant gesteigerte Expression messbar war.

Zudem konnten deutliche Endothelschäden bei konventioneller Entnahme gemessen werden. Mit den fehlenden Endothelzellen fehlen gleichzeitig auch die WPB mit dem enthaltenen P-Selectin. Somit bleibt eine schnelle und gesteigerte Expression der Selektine aus, was in der hier vorliegenden Arbeit einem fehlenden Anstieg von P-Selectin bei konventioneller Entnahme entspricht. Außerdem muss beachtet werden, dass Adhäsionsmoleküle, welche in den Vasa vasorum exprimiert werden, in die Messungen einfließen. In einer Studie von Chester et al. konnte ICAM-1 auf den Endothelzellen der Vasa vasorum immunhistochemisch eindeutig identifiziert werden, während VCAM-1 deutlich schwächer und E-Selectin nahezu nicht nachweisbar war (Chester et al., 1998b). Dies lässt die Vermutung nahe, dass VCAM-1 und vor allem P-Selectin in den Vasa vasorum nur sehr schwach exprimiert werden und ein Unterschied zwischen beiden Entnahmemethoden daher schwerer detektierbar ist als für ICAM-1.

4.2.3 Endotheliale NO-Synthase

Bei den Prozessen der VGD spielt NO als vasoprotektiver Faktor und Regulator der kardiovaskulären Homöostase eine entscheidende Rolle. So wirkt NO durch Hemmung der Thrombozytenaggregation antithrombotisch (Radomski et al., 1990) und durch Hemmung der Expression der Adhäsionsmoleküle für Leukozyten antiadhäsiv (De Caterina et al., 1995). Zudem hat es eine antiproliferative Wirkung durch Reduktion der VSMC-Proliferation und –Migration (Garg and Hassid, 1989) und führt hierdurch zu einer Verlangsamung der Intima Hyperplasie. Über seine vasodilatierende Funktion reguliert es den Blutdruck und führt hierüber zu einer Reduktion der Scherkräfte am Endothel.

Aufgrund seiner sehr kurzen Halbwertszeit im Sekundenbereich (Jeremy et al., 1999)(Napoli et al., 2006) ist NO instabil und muss ständig neu synthetisiert werden. Dies geschieht über die NO-Synthasen welche aus der Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff NO synthetisieren. Von den insgesamt drei Isoformen der NO-Synthase (Förstermann et al., 1994), spielt die eNOS in Endothelzellen die entscheidende Rolle für die VGD. eNOS wird konstitutiv von Endothelzellen gebildet und liegt intrazellulär membranassoziiert in Caveolae vor (George and Johnson, 2010). Durch Stimuli wie Scherstress, Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone sowie Medikamente kann die eNOS jedoch in seiner Expression stark reguliert werden (Li et al., 2002).

Mehrere Studien konnten immunhistochemisch zeigen, dass eine deutliche Reduktion von eNOS nach konventioneller Entnahme der VSM eintritt (Nowicki et al., 2004) (Dashwood et al., 2005). In der hier vorliegenden Arbeit konnten nur geringe Mengen an eNOS mittels Fluoreszenzimmunhistochemie nachgewiesen werden, sodass eine Quantifizierung für beide Gruppen nicht möglich war. Aufgrund dieser Ergebnisse folgte eine weitere molekularbiologische Analyse der Proben. Hierbei zeigte sich jedoch sowohl im Western-Blot als auch mittels qRT-PCR kein signifikanter Unterschied der eNOS der VSM im direkten Vergleich beider Entnahmemethoden. Entsprechend der Literatur wäre eine reduzierte Menge an eNOS bei konventioneller Entnahme zu erwarten gewesen. So konnten Dashwood und Kollegen mittels Immunhistochemie und Western-Blotting eine Reduktion von eNOS sowie mittels Citrullin Assay eine reduzierte eNOS-Aktivität bei konventioneller Entnahme (Spüldruck 300 mmHg für eine Minute) im Vergleich zu einer „no-touch“-Technik ohne Spülen der VSM zeigen (Dashwood et al., 2005). Vergleichbare Ergebnisse konnten Nowicki et al. mit einer signifikanten eNOS-Reduktion bei Entnahme der VSM mittels konventioneller Methode im Vergleich zur minimal invasiven Entnahme zeigen (Nowicki et al., 2004). In einer Studie von Viaro et al. ließ sich mittels Immunhistochemie bereits nach Spülen mit 300 mmHg für lediglich 15 Sekunden eine deutliche Reduktion von eNOS nachweisen, während bei einem Spüldruck von 100 mmHg und 200 mmHg keine signifikante Reduktion im Vergleich zu ungespülten VSM auftraten (Viaro et al., 2010).

Die Reduktion von eNOS bei konventioneller Entnahme hängt stark von der Ausprägung der Endothelschädigung ab. Eine ausgeprägte Schädigung der Endothelzellschicht führt zu einem deutlichen reduzierten Nachweis von eNOS (Chello et al., 2003)(Viaro et al., 2010). Trotz deutlich schlechterer Endothelintegrität bei konventioneller Entnahme konnte in der hier vorliegenden Arbeit kein signifikanter Unterschied der eNOS-Menge gemessen werden. Hinokiyama und Kollegen kamen in ihrer Studie zum gleichen Ergebnis und konnten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied für eNOS im Vergleich von ungespülten und gespülten (100 – 150 mmHg) VSM zeigen, während Adhäsionsmoleküle deutlich hochreguliert wurden (Hinokiyama et al., 2006).

Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür kann beispielsweise der schwächere Einfluss der Dehnungskräfte auf die eNOS sein. So konnten Golledge und Kollegen zeigen, dass die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 rasch und vor allem durch Dehnungskräfte gesteigert werden, während eNOS langsam und vor allem durch longitudinale Scherkräfte beeinflusst wird (Golledge et al., 1997). Zusätzlich muss bedacht werden, dass auch bei Verwendung der VASOSHIELD-Spritze bereits ein

Spüldruck von 250 mmHg angewendet wurde und somit auch hierbei eine deutliche Reduktion der eNOS eintritt. So konnten Chester et. al beim Vergleich des Spüldrucks der VSM mit 5 mmHg, 100 mmHg und 300 mmHg eine deutliche eNOS-Reduktion bei 300 mmHg feststellen (Chester et al., 1998a).

Zudem konnte eNOS ebenfalls in der Tunica media nachgewiesen werden (Viaro et al., 2010). Da in der vorliegenden Arbeit durch die molekularbiologische Analyse ebenfalls eine Messung der in der Tunica media enthaltenen eNOS erfolgte, kann hierdurch eine Beeinflussung der Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden.

4.3 Kritikpunkte

Neben den Stärken des Versuchsaufbaus dieser Arbeit müssen auch mögliche Schwachpunkte, welche zur Beeinflussung der Messwerte geführt haben könnten, kritisch diskutiert werden, um bei der Durchführung künftiger Studienmodelle eine Verfälschung der Ergebnisse zu minimieren.

So kommt als möglicher Einflussfaktor auf die Ergebnisse die variable Dauer bis zur endgültigen Fixierung der Proben in flüssigem Stickstoff in Frage. Durch die operative Entnahme der VSM kommt es zu einer Unterbrechung der Blutversorgung über die Vasa vasorum und folglich zu einer Ischämie, welche wiederum eine Schädigung des Endothels begünstigt (Thatte and Khuri, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die Zeitspanne zwischen operativer Entnahme der VSM und Fixierung in Stickstoff nicht standardisiert, sodass durch eine verschieden lange Ischämiedauer eine unterschiedlich starke Beeinflussung der Endothelintegrität möglich erscheint. Durch Festlegung eine einheitlichen Ischämiezeit könnte in künftigen Studien dieser Einflussfaktor völlig eliminiert werden.

Weiterhin konnten verschiedene Studien einen Einfluss der Lösung, in welchem das entnommene Transplantat gelagert wird, auf die Bypassqualität nachweisen (Tsakok et al., 2012). So gibt es erste Hinweise darauf, dass eine Lagerung in Blut derer in Kochsalz-Lösung überlegen ist (Schaeffer et al., 1997)(Chong et al., 2001). Die Studienlage ist hierzu jedoch noch sehr heterogen. In unserer Arbeit wurden die Proben sowohl in heparinisiertem Blut als auch in herkömmlicher NaCl-Lösung gelagert, sodass eine Beeinflussung der Ergebnisse in beiden Gruppen hierdurch möglich scheint. Es gilt jedoch zu beachten, dass die Anzahl der Proben, welche in

NaCl gelagert wurden, in beiden Gruppen gering und anteilig nahezu gleich war (VASOSHIELD: $n = 4$, 10% aller Proben; Konventionell: $n = 6$, 14% aller Proben). Hierdurch war eine mögliche negative Beeinflussung der Bypassqualität durch NaCl in beiden Gruppen gleich stark ausgeprägt und der Einfluss der Lagerungslösung kann insgesamt als nur sehr gering angesehen werden. In zukünftigen Studien könnte durch Lagerung in einer einzigen Lösung der Einfluss auf die Endothelintegrität gänzlich eliminiert werden.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die operative Entnahme der VSM durch verschiedenen Operateure, sodass als ein Kritikpunkt verschieden hohe Spüldrücke durch verschieden umsichtiges Spülen der VSM diskutiert werden muss. Hypothetisch könnte somit eine Standardisierung durch lediglich einen Operateur die Streubreite der Spüldrücke reduziert werden. Khaleel und Kollegen konnte jedoch zeigen, dass auch bei Entnahme der VSM durch lediglich zwei verblindete Operateure die intraoperativ durchschnittlich gemessenen Spüldrücke eine deutliche Streuung von <150 mmHg bis > 400 mmHg aufwiesen (Khaleel et al., 2012). Somit kann auch durch Festlegung eines einzigen Operateurs keine Standardisierung des Spüldrucks erreicht werden.

Zur Verbesserung der Methodik zukünftiger Studien wäre zudem eine intraoperative verblindete Messung der Spüldrücke zu diskutieren. Hierdurch könnte der durchschnittliche Spüldruck bei Verwendung der herkömmlichen Spritze ermittelt werden und dann ein direkter Vergleich mit dem Spüldruck der VASOSHIELD-Spritze erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde der angewendete Druck der herkömmlichen Spritze nicht ermittelt. Es ist deshalb durchaus möglich, dass durch umsichtige Operateure bei Anwendung der konventionellen Spritze ein Spüldruck angewendet wurde, welcher sehr nahe an den 250 mmHg der VASOSHIELD-Spritze lag. Durch diese möglicherweise geringen Differenzen der Spüldrücke beider Spritzen können die in dieser Arbeit gemessenen Unterschiede der Targets entsprechend geringer ausgefallen sein.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Es konnte in der vorliegenden Arbeit mittels verschiedener Untersuchungsmethoden eine verstärkte Schädigung der Gefäße bei konventioneller und somit nicht drucklimitierter Entnahme festgestellt werden.

Immunhistologisch zeigte sich, dass die hohen Spitzendrücke während der konventionellen Gefäßentnahme zu einer verstärkten Endothelschädigung im Sinne von Einrissen und großflächigen Abtragungen führen.

Entgegen der bestehenden Literatur konnte kein Einfluss der Entnahmemethode auf die endotheliale NO-Synthase festgestellt werden. Dies lässt sich jedoch dadurch erklären, dass die druckregulierte Spritze in der vorliegenden Studie klinische Anwendung fand. Der hierbei aufgebaute Druck von 250 mmHg ist daher höher als in Kontrollgruppen anderer Studien. Dieser Druck ist jedoch klinisch notwendig, um das entnommene Gefäß auch als Bypassgefäß nutzen zu können.

Bei der Analyse der Adhäsionsmoleküle konnte für ICAM-1 und VCAM-1 mittels qRT-PCR eine signifikante Steigerung bei konventioneller Entnahme gemessen werden. Dies zeigt eine größere Stressreaktion und entsprechend eine größere Schädigung der VSM durch den erhöhten Spüldruck. In der vorliegenden Arbeit konnte entgegen der bestehenden Literatur kein signifikanter Unterschied für P-Selectin gemessen werden. Dies lässt sich durch die großflächigen Endothelverluste bei konventioneller Entnahme erklären, welche folglich mit einem Fehlen der mit P-Selectin gefüllten WPB einhergehen.

Anhand der Ergebnisse zur Endothelintegrität sowie für die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 lässt sich schlussfolgern, dass durch Verwendung der VASOSHIELD-Spritze durchaus eine Schädigung der VSM reduziert werden kann. Ob hierdurch jedoch das Risiko eines künftigen Bypassverschlusses vermindert werden kann, kann abschließend nur in einer klinischen Studie mit Kontrolle der Bypassfunktion (z.B. mittels CA) geklärt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung: Die Koronare Herzkrankheit stellt weltweit eine der häufigsten Todesursachen dar. Eine Therapieoption hierfür ist die koronare Bypassoperation. Trotz der deutlich reduzierten Offenheitsrate im Vergleich zu arteriellen Bypassgefäßen wird die Vena saphena magna in ca. 76% aller Bypassoperationen in Deutschland als Bypassstransplantat verwendet.

Zielsetzung: Ziel dieser Arbeit war es als erste prospektive randomisierte Studie den Einfluss des Spüldrucks auf die Qualität der Vena saphena magna im Rahmen einer koronaren Bypassoperation zu untersuchen.

Material und Methoden: Es wurden 83 Patienten randomisiert in zwei Gruppen eingeteilt. In einer Gruppe erfolgte die Entnahme der Vena saphena magna mittels druckkontrollierter VASOSHIELD-Spritze (Spüldruck 250 mmHg), während in der anderen Gruppe eine herkömmliche Spritze ohne Druckkontrolle verwendet wurde. Anschließend erfolgte die immunhistochemische und molekularbiologische Analyse (Western-Blot und qRT-PCR) des Endothelmarkers CD31, der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und P-Selectin sowie der endothelialen NO-Synthase.

Ergebnisse: Bei konventioneller Entnahme war der Endothelmarker CD31 immunhistochemisch deutlich geringer messbar und Endothelschäden über 50% des Lumenumfangs traten hierbei deutlich häufiger auf ($p = 0,074$). Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 waren mittels qRT-PCR bei konventioneller Entnahme statistisch signifikant verstärkt messbar (ICAM-1: $p = 0,001$ und VCAM-1: $p = 0,004$). Für P-Selectin als auch eNOS konnten weder mittels Western-Blot noch qRT-PCR relevante Unterschiede gemessen werden.

Schlussfolgerung: Durch Verwendung der VASOSHIELD-Spritze können großflächige Endothelschäden sowie eine gesteigerte Expression der Inflammationsmarker ICAM-1 und VCAM-1 reduziert werden. Ob die Verwendung einer druckregulierten Spritze zu einer verringerten Bypassverschlussrate führt, muss abschließend in einer klinischen Studie mit angiographischer Kontrolle der Bypassfunktion geklärt werden.

6 SUMMARY

Introduction: The coronary heart disease is one of the leading causes of death in the world. One of the therapeutic options is the coronary artery bypass surgery. Despite its inferior patency rates compared to arterial grafts, the human saphenous vein is still used as a bypass graft in nearly 76% of all bypass surgeries in Germany.

Objective: As the first prospective randomized trial, the objective of this study was to study the influence of flushing pressure on the graft quality of the human saphenous vein in bypass surgery.

Material & Methods: 83 Patients were randomized in two groups. In one group the VSM was prepared with the VASOSHIELD pressure controlling syringe (250 mmHg flushing pressure), while in the other group a conventional syringe without pressure control was being used. After preparation in the laboratory, we used immunohistochemical analysis as well as western blot and qRT-PCR to analyze the endothelial marker CD31, the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and P-Selectin and finally the endothelial NO-synthase.

Results: With the use of a conventional syringe the endothelial marker CD31 was less detectable in the VSM and extensive endothelial damage above 50% of the lumen was more frequent with the conventional technique ($p = 0,074$). Through qRT-PCR, the adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 were significantly increased after using the syringe without pressure control (ICAM-1: $p = 0,001$ and VCAM-1: $p = 0,004$). For the targets P-Selectin and eNOS there were no relevant differences between both syringes.

Conclusion: By using the VASOSHIELD pressure controlling syringe, extensive endothelial damage can be prevented and the upregulation and expression of the inflammatory markers ICAM-1 and VCAM1 can be reduced. If the use of a pressure controlling syringe can reduce the rate of graft failure has to be further tested in a clinical trial with angiographic follow-up of graft patency.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

♂	Mann, männlich
♀	Frau, weiblich
λ	Lambda, Wellenlänge
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol
A.	Arterie
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AK	Antikörper
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AT III	Antithrombin III
AU	Arbitrary unit, willkürliche Einheit
bp	Basenpaare
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	bovine serum albumin, Rinderalbumin
©	Copyright
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CA	Koronarangiographie
CABG	Coronary artery bypass grafting, Koronararterielle Bypassoperation
CAM	Cell adhesion molecule, Adhäsionsmolekül
CD 31	Cluster of Differentiation 31 (<i>auch</i> : PECAM-1)
CD 54	Cluster of Differentiation 54 (<i>auch</i> : ICAM-1)
CD 62 P	Cluster of Differentiation 62 (<i>auch</i> : P-Selectin)

CD 106	Cluster of Differentiation 106 (<i>auch</i> : VCAM-1)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CT	Cycle Threshold, Zyklus Schwellenwert
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid
dd H ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
Δ	<i>Griechisch</i> : Delta, <i>mathematisch</i> : Differenz
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase
et al.	<i>lateinisch</i> : und andere
FAM	6-FAM-phosphoramidit
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HCl	Wasserstoffchlorid, Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLM	Herz-Lungen-Maschine
H ₂ O	Wasser
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
Hz	Hertz (Frequenz, wiederholte Vorgänge pro Sekunde)
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1 (<i>siehe</i> : CD 54)
IL	Interleukin
IMA	Arteria mammaria interna, interna mammary artery
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Konz.	Konzentration
LDL	Low-Density Lipoprotein
LIMA	Left Internal Mammary Artery, Arteria mammaria interna sinistra

Lp (a)	Lipoprotein (a)
m	Meter
M	molare Masse
mg	Milligramm
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW ± SEM	Mittelwert ± Standardfehler
NaCl	Natriumchlorid, isotonische Kochsalzlösung
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffsynthetase
ONCAB	On-pump CABG, mit Herz-Lungen-Maschine
OPCAB	Off-pump CABG, ohne Herz-Lungen-Maschine
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PFA	Paraformaldehyd
PGI ₂	Prostazyklin
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
®	Registered Trademark
RA	Arteria radialis, radial artery
RCA	Right coronary artery, A. coronaria dextra
RCX	Ramus circumflexus
RIMA	Right Internal Mammary Artery, Arteria mammaria interna dextra
RIVA	Ramus interventrikularis anterior
RNA	Ribonukleinsäure

ROS	reaktive Sauerstoffspezies, Superoxid-Radikale
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCAD	Stabile koronare Herzkrankheit, stable coronary artery disease
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumlaurylsulfat
SEM	standard error of mean, Standardfehler
SELP	P-Selectin (<i>siehe</i> : CD 62 P)
sog.	so genannt
TA	Tunica adventitia
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamin
TBST	Tris-Base Natrium-Tween Puffer
Temp.	Temperatur
TI	Tunica intima
TM	Tunica media
™	Unregistered Trademark
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
t-PA	Tissue plasminogen activator
TXA ₂	Thromboxan
U	Enzymeinheit (Enzymmenge, die 1 μ mol Substrat pro min umwandelt)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
V	Volt
V.	Vene
VCAM-1	Vaskuläres Zell Adhäsions Moleküle 1 (<i>siehe</i> : CD 106)
VGD	vein graft disease
vs.	versus
VSM	Vena saphena magna
VSMC	Vascular smooth muscle cell, glatte Gefäßmuskulatur
Vv	Vasa vasorum
WB	Western-Blot
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
WPB	Weibel-Palade-Körperchen, Weibel-Palade bodies
z.B.	zum Beispiel

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: VASOSHIELD-Spritze mit Druckkontrolle	17
Abbildung 2: Schema des Mechanismus der Druckeinstellung inkl. Ablassventil	18
Abbildung 3: Schema der Venen-Präparation nach operativer Entnahme	21
Abbildung 4: Schema der RNA-Isolation im vollautomatischen QIAcube	29
Abbildung 5: Schema der Reversen Transkription (SuperScript®-Protokoll)	30
Abbildung 6: Schema der PCR	32
Abbildung 7: Schema der elektrophoretischen Protein-Auftrennung in einem Polyacrylamid-Gel	37
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Proteintransfers vom Gel auf eine Membran	39
Abbildung 9: Schema der indirekten Immunfärbung	40
Abbildung 10: HE-Färbung der VSM	43
Abbildung 11: CD31-positive Endothelstrecke und Endothelschäden	44
Abbildung 12: Vergleich der Endothelschäden (CD31) je nach Gruppe	45
Abbildung 13: Boxplot mit CD31-Anteil nach Gruppen	46
Abbildung 14: Probenverteilung je Gruppe mit mehr oder weniger als 50% Endothelschädigung	47
Abbildung 15: Immunfluoreszenzhistochemie des Adhäsionsmoleküls ICAM-1	49
Abbildung 16: Boxplot mit dem Fold Change von ICAM-1 in der qRT-PCR	50
Abbildung 17: Western-Blot für ICAM-1	51
Abbildung 18: Boxplot mit ICAM-1 Pixelintensität im Western-Blot	52
Abbildung 19: Boxplot mit dem Fold Change von VCAM-1 in der qRT-PCR	53
Abbildung 20: Immunfluoreszenzhistochemie der Targets P-Selectin	54
Abbildung 21: Boxplot mit dem Fold Change von P-Selectin in der qRT-PCR	55
Abbildung 22: Western-Blot für P-Selectin	56
Abbildung 23: Boxplot mit P-Selectin Pixelintensität im Western-Blot	57
Abbildung 24: Immunfluoreszenzhistochemie der Targets eNOS	58
Abbildung 25: Boxplot mit dem Fold Change von eNOS in der qRT-PCR	59

Abbildung 26: Western-Blot für eNOS	60
Abbildung 27: Boxplot mit eNOS Pixelintensität im Western-Blot	61
Abbildung 28: Boxplot aller Targets in der qRT-PCR nach Gruppen	62
Abbildung 29: Boxplot aller Targets im Western-Blot nach Gruppen	62

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Indikation zur Revaskularisationstherapie bei SCAD nach Evidenzklasse	4
Tabelle 2: Durchgängigkeit [%] der verschiedenen Transplantate nach CABG	6
Tabelle 3: Probenverteilung auf die Untersuchungsgruppen	16
Tabelle 4: Färbeprotokoll für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung	23
Tabelle 5: Färbeprotokoll für CD31	25
Tabelle 6: Färbeprotokoll für eNOS, ICAM-1 und P-Selectin	26
Tabelle 7: Master-Mix Ansatz für die SYBR Green Real Time PCR	34
Tabelle 8: Master-Mix Ansatz für die TaqMan Real Time PCR	34
Tabelle 9: Zykluseinstellungen der Real-Time PCR	35

7.4 Literaturverzeichnis

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1951): 265-275
- Alexander, J.H., Harrington, R.A., Peterson, E.D., Ferguson, T.B., Lorenz, T.J., Goyal, A., Gibson, M., Mack, M.J., Gennevos, D., Califf, R.M., et al. (2005). Efficacy and Safety of Edifoligide, and E2F Transcription Factor Decoy, for Prevention of Vein Graft Failure Following Coronary Artery Bypass Graft Surgery. PREVENT IV: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 294, 2446–2454.
- Allaire, E., and Clowes, A.W. (1997). Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the intimal hyperplastic response. *Ann. Thorac. Surg.* 63, 582–591.
- AQUA (2015). Qualitätsindikatoren - Koronarchirurgie, isoliert (2014).

- Bagot, C.N., and Arya, R. (2008). Virchow and his triad: a question of attribution. *Br. J. Haematol.* 143, 180–190.
- Bella, J., Kolatkar, P.R., Marlor, C.W., Greve, J.M., and Rossmann, M.G. (1998). The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor and as an LFA-1 integrin ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 4140–4145.
- Bonfanti, R., Furie, B.C., Furie, B., and Wagner, D.D. (1989). PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* 73, 1109–1112.
- Boylan, M.J., Lytle, B.W., Loop, F.D., Taylor, P.C., Borsh, J.A., Goormastic, M., and Cosgrove, D.M. (1994). Surgical treatment of isolated left anterior descending coronary stenosis. Comparison of left internal mammary artery and venous autograft at 18 to 20 years of follow-up. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 107, 657–662.
- Burnette, W.N. (1981). “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195–203.
- Buxton, B.F., and Galvin, S.D. (2013). The history of arterial revascularization: from Kolesov to Tector and beyond. *Ann. Cardiothorac. Surg.* 2, 419.
- Cao, C., Manganas, C., Horton, M., Bannon, P., Munkholm-Larsen, S., Ang, S.C., and Yan, T.D. (2013). Angiographic outcomes of radial artery versus saphenous vein in coronary artery bypass graft surgery: A meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 146, 255–261.
- Cataldo, G., Braga, M., Pirodda, N., Lavezzari, M., Rovelli, F., and Marubini, E. (1993). Factors influencing 1-year patency of coronary artery saphenous vein grafts. Studio Indobufene nel Bypass Aortocoronarico (SINBA). *Circulation* 88, II93–II98.
- De Caterina, R., Libby, P., Peng, H.-B., Thannickal, V.J., Rajavashisth, T.B., Gimbrone Jr, M.A., Shin, W.S., and Liao, J.K. (1995). Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J. Clin. Invest.* 96, 60.
- Chello, M., Mastroroberto, P., Frati, G., Patti, G., D'Ambrosio, A., Di Sciascio, G., and Covino, E. (2003). Pressure distension stimulates the expression of endothelial adhesion molecules in the human saphenous vein graft. *Ann. Thorac. Surg.* 76, 453–458.
- Chester, A.H., Borland, J.A.A., Taylor, P.M., Rose, M.L., and Yacoub, M.H. (1996). Vascular adhesion molecules and immunogenicity in blood vessels used as coronary artery bypass grafts. *Eur J Cardio-Thorac Surg* 10, 676–683.
- Chester, A.H., Buttery, L.D.K., Borland, J.A.A., Springall, D.R., Rothery, S., Severs, N.J., Polak, J.M., and Yacoub, M.H. (1998a). Structural, biochemical and functional effects of distending pressure in the human saphenous vein: implications for bypass grafting. *Coron. Artery Dis.* 9, 143–151.

- Chester, A.H., Morrison, K.J., and Yacoub, M.H. (1998b). Expression of vascular adhesion molecules in saphenous vein coronary bypass grafts. *Ann. Thorac. Surg.* 65, 1685–1689.
- Chong, W.C.F., Ong, P.J.L., Moat, N., and Collins, P. (2004). Effects of hydrostatic distention on in vitro vasoreactivity of radial artery conduits. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 128, 609–614.
- Chong, W.C.F., Ong, P.J.L., Hayward, C., Moat, N., and Collins, P. (2001). Effects of storage solutions on in vitro vasoreactivity of radial artery conduits. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 122, 470–475.
- Cook, J.M., Cook, C.D., Marlar, R., Solis, M.M., Fink, L., and Eidt, J.F. (1991). Thrombomodulin activity on human saphenous vein grafts prepared for coronary artery bypass. *J. Vasc. Surg.* 14, 147–151.
- Cox, J., Chiasson, D., and Gotlieb, A. (1991). Stranger in a strange land: the pathogenesis of saphenous vein graft stenosis with emphasis on structural and functional differences between veins and arteries. *Prog Cardiovasc Dis* 34, 45–68.
- Crook, M.F., Newby, A.C., and Southgate, K.M. (2000). Expression of intercellular adhesion molecules in human saphenous veins: effects of inflammatory cytokines and neointima formation in culture. *Atherosclerosis* 150, 33–41.
- Crook, M.F., Southgate, K.M., and Newby, A.C. (2008). Both ICAM-1-and VCAM-1-integrin interactions are important in mediating monocyte adhesion to human saphenous vein. *J. Vasc. Res.* 39, 221–229.
- Dashwood, M.R., and Loesch, A. (2007). Surgical damage of the saphenous vein and graft patency. *J Thorac Cardiovasc Surg* 133, 274–275.
- Dashwood, M.R., and Tsui, J.C. (2013). “No-touch” saphenous vein harvesting improves graft performance in patients undergoing coronary artery bypass surgery: A journey from bedside to bench. *Vascul. Pharmacol.* 58, 240–250.
- Dashwood, M.R., Savage, K., Dooley, A., Shi-Wen, X., Abraham, D.J., and Souza, D.S.R. (2005). Effect of Vein Graft Harvesting on Endothelial Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide Production. *Ann. Thorac. Surg.* 80, 939–944.
- Dashwood, M.R., Savage, K., Tsui, J.C.S., Dooley, A., Shaw, S.G., Fernández Alfonso, M.S., Bodin, L., and Souza, D.S.R. (2009). Retaining perivascular tissue of human saphenous vein grafts protects against surgical and distension-induced damage and preserves endothelial nitric oxide synthase and nitric oxide synthase activity. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 138, 334–340.
- Davies, M.G., and Hagen, P.-O. (1995). Pathophysiology of vein graft failure: A review. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 9, 7–18.
- Davis, K.B., Chaitman, B., Ryan, T., Bittner, V., and Kennedy, J.W. (1995). Comparison of 15-Year Survival for Men and Women After Initial Medical or Surgical Treatment for Coronary Artery Disease: A CASS Registry Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 25, 1000–1009.

- Deb, S., Cohen, E.A., Singh, S.K., Une, D., Laupacis, A., and Fries, S.E. (2012). Radial Artery and Saphenous Vein Patency More Than 5 Years After Coronary Artery Bypass Surgery. *J. Am. Coll. Cardiol.* 60, 28–35.
- Deo, S.V., Dunlay, S.M., Shah, I.K., Altarabsheh, S.E., Erwin, P.J., Boilson, B.A., Park, S.J., and Joyce, L.D. (2013). Dual Anti-platelet Therapy After Coronary Artery Bypass Grafting: Is There Any Benefit? A Systematic Review and Meta-Analysis: DUAL ANTI-PLATELET THERAPY AFTER CORONARY ARTERY. *J. Card. Surg.* 28, 109–116.
- Desai, M., Mirzay-Razzaz, J., von Delft, D., Sarkar, S., Hamilton, G., and Seifalian, A.M. (2010). Inhibition of neointimal formation and hyperplasia in vein grafts by external stent/sheath. *Vasc. Med.* 15, 287–297.
- Deutsche Herzstiftung (2013). Deutscher Herzbericht 2013.
- Didenko, V.V. (2001). DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications. *BioTechniques* 31, 1106–1121.
- Dreifalder, M., Souza, D.S.R., Loesch, A., Muddle, J.R., Karlsson, M.G., Filbey, D., Bodin, L., Norgren, L., and Dashwood, M.R. (2011). The “no-touch” harvesting technique for vein grafts in coronary artery bypass surgery preserves an intact vasa vasorum. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 141, 145–150.
- Dumanski, A., Sopel, M., Pelczar, M., Szlapka, M., Kustrzycki, W., and Zabel, M. (2007). Influence of pressure on the endothelium of the saphenous vein coronary artery bypass graft. *In Vivo* 21, 785–789.
- Eagle, K.A. (2004). ACC/AHA 2004 Guideline Update for Coronary Artery Bypass Graft Surgery: Summary Article: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Update the 1999 Guidelines for Coronary Artery Bypass Graft Surgery). *Circulation* 110, 1168–1176.
- Eppihimer, M.J., Russell, J., Anderson, D.C., Epstein, C.J., Laroux, S., and Granger, D.N. (1997). Modulation of P-selectin expression in the postischemic intestinal microvasculature. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 273, 1326–1332.
- Epstein, F.H., and Ross, R. (1999). Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340, 115–126.
- Eritsland, J., Arnesen, H., Seljeflot, I., Abdelnoor, M., Grønseth, K., Berg, K., and Malinow, M.R. (1994). Influence of Serum Lipoprotein(a) and Homocyst(e)ine Levels on Graft Patency After Coronary Artery Bypass Grafting. *Am J Cardiol* 74, 1099–1102.
- Farooq, V., van Klaveren, D., Steyerberg, E.W., Meliga, E., Vergouwe, Y., Chieffo, A., Kappetein, A.P., Colombo, A., Holmes, D.R., Mack, M., et al. (2013). Anatomical and clinical characteristics to guide decision making between coronary artery bypass surgery and percutaneous coronary intervention for individual patients: development and validation of SYNTAX score II. *The Lancet* 381, 639–650.
- Favaloro, R. (1983). The present era of myocardial revascularization — some historical landmarks. *Int. J. Cardiol.* 4, 331–344.

- Favaloro, R.G. (1971). Surgical treatment of coronary arteriosclerosis by the saphenous vein graft technique: critical analysis. *Am. J. Cardiol.* 28, 493–495.
- Favaloro, R.G. (1998). Critical Analysis of Coronary Artery Bypass Graft Surgery: A 30-Year Journey. *J. Am. Coll. Cardiol.* 31, 1B – 63B.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Ann. Phys.* 437, 55–75.
- Förstermann, U., Closs, E.I., Pollock, J.S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., and Kleinert, H. (1994). Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23, 1121–1131.
- Funkat, A., Beckmann, A., Lewandowski, J., Frie, M., Ernst, M., Schiller, W., Gummert, J., and Cremer, J. (2014). Cardiac Surgery in Germany during 2013: A Report on Behalf of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 62, 380–392.
- Gansera, B., Schmidtler, F., Angelis, I., Kiask, T., Kemkes, B., and Botzenhardt, F. (2007). Patency of Internal Thoracic Artery Compared to Vein Grafts - Postoperative Angiographic Findings in 1189 Symptomatic Patients in 12 Years. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 55, 412–417.
- Garg, U.C., and Hassid, A. (1989). Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 83, 1774.
- Garrett H, Dennis EW, and DeBakey ME (1996). Aortocoronary bypass with saphenous vein graft: Seven-year follow-up. *JAMA* 276, 1517–1520.
- Gavaghan, T.P., Gebiski, V., and Baron, D.W. (1991). Immediate postoperative aspirin improves vein graft patency early and late after coronary artery bypass graft surgery. A placebo-controlled, randomized study. *Circulation* 83, 1526–1533.
- George, S.J., and Johnson, J. (2010). *Atherosclerosis - Molecular and Cellular Mechanisms* (Chichester, UK: Wiley-Blackwell).
- Glagov, S., Weisenberg, E., Zarins, C.K., Stankunavicius, R., and Kolettis, G.J. (1987). Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N. Engl. J. Med.* 316, 1371–1375.
- Goldman, S., Copeland, J., Moritz, T., Henderson, W., Zadina, K., Ovitt, T., Doherty, J., Chesler, E., and Sako, Y. (1989). Saphenous vein graft patency 1 year after coronary artery bypass surgery and effects of antiplatelet therapy. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *Circulation* 80, 1190–1197.
- Goldman, S., Copeland, J., Moritz, T., Henderson, W., Zadina, K., Ovitt, T., Kern, K.B., Sethi, G., Sharma, G.V., and Khuri, S. (1991). Starting aspirin therapy after operation. Effects on early graft patency. Department of Veterans Affairs Cooperative Study Group. *Circulation* 84, 520–526.
- Goldman, S., Copeland, J., Moritz, T., Henderson, W., Zadina, K., Ovitt, T., Kern, K.B., Sethi, G., Sharma, G.V., and Khuri, S. (1994). Long-term graft patency (3 years) after coronary artery surgery. Effects of aspirin: results of a VA Cooperative study. *Circulation* 89, 1138–1143.

- Golledge, J., Turner, R.J., Harley, S.L., Springall, D.R., and Powell, J.T. (1997). Circumferential deformation and shear stress induce differential responses in saphenous vein endothelium exposed to arterial flow. *J. Clin. Invest.* 99, 2719.
- Hahne, M., Jäger, U., Isenmann, S., Hallmann, R., and Vestweber, D. (1993). Five tumor necrosis factor-inducible cell adhesion mechanisms on the surface of mouse endothelioma cells mediate the binding of leukocytes. *J. Cell Biol.* 121, 655–664.
- Harskamp, R.E., Lopes, R.D., Baisden, C.E., de Winter, R.J., and Alexander, J.H. (2013). Saphenous Vein Graft Failure After Coronary Artery Bypass Surgery: Pathophysiology, Management, and Future Directions. *Ann. Surg.* 257, 824–833.
- Hasse, J., Graedel, E., Hofer, H., Guggenheim, R., Amsler, B., and Mihatsch, M.J. (1981). Morphologic Studies in Saphenous Vein Grafts for Aorto-coronary Bypass Surgery Part II: Influence of Pressure-limited Graft Dilation. *Thorac Cardivasc Surg.* 29, 38–40.
- Hinokiyama, K., Valen, G., Tokuno, S., Vedin, J.B., and Vaage, J. (2006). Vein Graft Harvesting Induces Inflammation and Impairs Vessel Reactivity. *Ann. Thorac. Surg.* 82, 1458–1464.
- Hofer, H., Mihatsch, M.J., Guggenheim, R., Amsler, B., Hasse, J., and Graedel, E. (1981). Morphologic Studies in Saphenous Vein Grafts for Aorto-coronary Bypass Surgery. Part I: Morphology of the Graft Using Ordinary Surgical Preparatino Techniques. *Thorac Cardivasc Surg.* 29, 32–37.
- Hoff, H.F., Beck, G.J., Skibinski, C.I., Jürgens, G., O'Neil, J., Kramer, J., and Lytle, B. (1988). Serum Lp (a) level as a predictor of vein graft stenosis after coronary artery bypass surgery in patients. *Circulation* 77, 1238–1244.
- Huo, Y., and Ley, K. (2001). Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol. Scand.* 173, 35–43.
- Ilan, N., and Madri, J.A. (2003). PECAM-1: old friend, new partners. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 515–524.
- Jang, Y., Lincoff, A.M., Plow, E.F., and Topol, E.J. (1994). Cell Adhesion Molecules in Coronary Artery Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 24, 1591–1601.
- Jeremy, J.Y., Rowe, D., Emsley, A.M., and Newby, A.C. (1999). Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* 43, 580–594.
- Jeremy, J.Y., Yim, A.P., Wan, S., and Angelini, G.D. (2002). Oxidative Stress, Nitric Oxide, and Vascular Disease. *J. Card. Surg.* 17, 324–327.
- Kalan, J.M., and Roberts, W.C. (1990). Morphologic findings in saphenous veins used as coronary arterial bypass conduits for longer than 1 year: necropsy analysis of 53 patients, 123 saphenous veins, and 1865 five-millimeter segments of veins. *Am. Heart J.* 119, 1164–1184.
- Khaleel, M.S., Dorheim, T.A., Duryee, M.J., Durbin, H.E., Bussey, W.D., Garvin, R.P., Klassen, L.W., Thiele, G.M., and Anderson, D.R. (2012). High-Pressure Distention of the Saphenous Vein During Preparation Results in Increased Markers of Inflammation: A Potential Mechanism for Graft Failure. *Ann. Thorac. Surg.* 93, 552–558.

- Kim, F.Y., Marhefka, G., Ruggiero, N.J., Adams, S., and Whellan, D.J. (2013). Saphenous Vein Graft Disease: Review of Pathophysiology, Prevention, and Treatment. *Cardiol. Rev.* 21, 101–109.
- Knatterud, G.L., Rosenberg, Y., Campeau, L., Geller, N.L., Hunninghake, D.B., Forman, S.A., Forrester, J.S., Gobel, F.L., Herd, J.A., Hickey, A., et al. (2000). Long-term effects on clinical outcomes of aggressive lowering of low-density lipoprotein cholesterol levels and low-dose anticoagulation in the Post Coronary Artery Bypass Graft trial. *Circulation* 102, 157–165.
- Kriegelstein, C.F., and Granger, D.N. (2001). Adhesion Molecules and Their Role in Vascular Disease. *Am J Hypertens* 14, 44–54.
- Kulik, A., Le May, M.R., Voisine, P., Tardif, J.-C., DeLarochelliere, R., Naidoo, S., Wells, G.A., Mesana, T.G., and Ruel, M. (2010). Aspirin Plus Clopidogrel Versus Aspirin Alone After Coronary Artery Bypass Grafting: The Clopidogrel After Surgery for Coronary Artery Disease (CASCADE) Trial. *Circulation* 122, 2680–2687.
- Lajos, T.Z., Robicsek, F., Thubrikar, M., and Urschel, H. (2007). Improving Patency of Coronary Conduits “Valveless” Veins and/or Arterial Grafts. *J. Card. Surg.* 22, 170–177.
- Lamy, A., Devereaux, P.J., Prabhakaran, D., Taggart, D.P., Hu, S., Paolasso, E., Straka, Z., Piegas, L.S., Akar, A.R., Jain, A.R., et al. (2013). Effects of Off-Pump and On-Pump Coronary-Artery Bypass Grafting at 1 Year. *N. Engl. J. Med.* 368, 1179–1188.
- Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Chang, S.Y., Landre, P.A., Abramson, R.D., and Gelfand, D.H. (1993). High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *Genome Res.* 2, 275–287.
- Li, F.D., Eagle, S., Brophy, C., Hocking, K.M., Osgood, M., Komalavilas, P., and Cheung-Flynn, J. (2014). Pressure Control During Preparation of Saphenous Veins. *JAMA Surg.* 149, 655.
- Li, H., Wallerath, T., and Förstermann, U. (2002). Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide* 7, 132–147.
- Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868–874.
- Libby, P. (2004). Atherosclerosis: the new view. *Sci. Am.* 14, 50–59.
- Lie, J.T., Lawrie, G.M., and Morris, G.C.J. (1977). Aortocoronary bypass saphenous vein graft atherosclerosis. Anatomic study of 99 vein grafts from normal and hyperlipoproteinemic patients up to 75 months postoperatively. *Am. J. Cardiol.* 40, 906–914.
- Liu, S.Q., Ruan, Y.Y., Tang, D., Li, Y.C., Goldman, J., and Zhong, L. (2002). A possible role of initial cell death due to mechanical stretch in the regulation of subsequent cell proliferation in experimental vein grafts. *Biomech. Model. Mechanobiol.* 1, 17–27.

- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408.
- Loop, F.D., Golding, L.R., MacMillan, J.P., Cosgrove, D.M., Lytle, B.W., and Sheldon, W.C. (1983). Coronary artery surgery in women compared with men: analyses of risks and long-term results. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1, 383–390.
- Loop, F.D., Lytle, B.W., Cosgrove, D.M., Stewart, R.W., Goormastic, M., Williams, G.W., Golding, L.A., Gill, C.C., Taylor, P.C., and Sheldon, W.C. (1986). Influence of the internal-mammary-artery graft on 10-year survival and other cardiac events. *N. Engl. J. Med.* 314, 1–6.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., and others (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265–275.
- Manchio, J.V., Gu, J., Romar, L., Brown, J., Gammie, J., Pierson, R.N., Griffith, B., and Poston, R.S. (2005). Disruption of Graft Endothelium Correlates With Early Failure After Off-Pump Coronary Artery Bypass Surgery. *Ann. Thorac. Surg.* 79, 1991–1998.
- Marti, M.-C., Bouchardy, B., and Cox, J.N. (1971). Aorto-coronary by-pass with autogenous saphenous vein grafts: histopathological aspects. *Virchows Arch. A* 352, 255–266.
- McCready, R.A. (2013). Vein graft harvesting—handle with care. *J. Surg. Res.* 185, 507–508.
- McEver, R.P., Beckstead, J.H., Moore, K.L., Marshall-Carlson, L., and Bainton, D.F. (1989). GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J. Clin. Invest.* 84, 92.
- Meade, T.W. (1995). Fibrinogen in ischaemic heart disease. *Eur. Heart J.* 16, 31–35.
- Mehta, D., George, S.J., Jeremy, J.Y., Izzat, M.B., Southgate, K.M., Bryan, A.J., Newby, A.C., and Angelini, G.D. (1998). External stenting reduces long-term medial and neointimal thickening and platelet derived growth factor expression in a pig model of arteriovenous bypass grafting. *Nat. Med.* 4, 235–239.
- Meroni, P.L., and Tremoli, E. (2003). Modulation of adhesion molecule expression on endothelial cells: to be or not to be? *J. Thromb. Haemost.* 1, 2280–2282.
- Mitra, A.K., Gangahar, D.M., and Agrawal, D.K. (2006). Cellular, molecular and immunological mechanisms in the pathophysiology of vein graft intimal hyperplasia. *Immunol. Cell Biol.* 84, 115–124.
- Mohr, F.W., Morice, M.-C., Kappetein, A.P., Feldman, T.E., Stähle, E., Colombo, A., Mack, M.J., Holmes, D.R., Morel, M., Dyck, N.V., et al. (2013). Coronary artery bypass graft surgery versus percutaneous coronary intervention in patients with three-vessel disease and left main coronary disease: 5-year follow-up of the randomised, clinical SYNTAX trial. *The Lancet* 381, 629–638.

- Moor, E., Hamsten, A., Blomback, M., Herzfeld, I., Wiman, B., and Ryden, L. (1994). Haemostatic factors and inhibitors and coronary artery bypass grafting: preoperative alterations and relations to graft occlusion. *Thromb. Haemost.* 72, 335–342.
- Motwani, J.G., and Topol, E.J. (1998). Aortocoronary saphenous vein graft disease pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation* 97, 916–931.
- Muller, W.A., Weigl, S.A., Deng, X., and Phillips, D.M. (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.* 178, 449–460.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335–350.
- Muto, A., Model, L., Ziegler, K., Eghbalieh, S.D., and Dardik, A. (2010). Mechanisms of vein graft adaptation to the arterial circulation: insights into the neointimal algorithm and management strategies. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 74, 1501.
- Muzaffar, S. (2005). Acute hypoxia simultaneously induces the expression of gp91phox and endothelial nitric oxide synthase in the porcine pulmonary artery. *Thorax* 60, 305–313.
- Nachman, R.L., and Silverstein, R. (1993). Hypercoagulable states. *Ann. Intern. Med.* 119, 819–827.
- Nagel, T., Resnick, N., Atkinson, W.J., Dewey Jr, C.F., and Gimbrone Jr, M.A. (1994). Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 94, 885.
- Napoli, C., de Nigris, F., Williams-Ignarro, S., Pignalosa, O., Sica, V., and Ignarro, L.J. (2006). Nitric oxide and atherosclerosis: An update. *Nitric Oxide* 15, 265–279.
- Navab, M. (2004). Thematic review series: The Pathogenesis of Atherosclerosis: The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J. Lipid Res.* 45, 993–1007.
- Nguyen, H.C., Grossi, E.A., LeBoutillier, M. 3rd, Steinberg, B.M., Rifkin, D.B., Baumann, F.G., Colvin, S.B., and Galloway, A.C. (1994). Mammary artery versus saphenous vein grafts: assessment of basic fibroblast growth factor receptors. *Ann. Thorac. Surg.* 58, 308–310; discussion 310–311.
- Nishioka, T., Luo, H., Berglund, H., Eigler, N.L., Kim, C.-J., Tabak, S.W., and Siegel, R.J. (1996). Absence of Focal Compensatory Enlargement or Constriction in Diseased Human Coronary Saphenous Vein Bypass Grafts: An Intravascular Ultrasound Study. *Circulation* 93, 683–690.
- Nowicki, M., Buczkowski, P., Miskowiak, B., Konwerska, A., Ostalska-Nowicka, D., and Dyszkiewicz, W. (2004). Immunocytochemical Study on Endothelial Integrity of Saphenous Vein Grafts Harvested by Minimally Invasive Surgery with the Use of Vascular Mayo Strippers. A Randomized Controlled Trial. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 27, 244–250.
- O'Connor, N.J., Morton, J.R., Birkmeyer, J.D., Olmstead, E.M., and O'Connor, G.T. (1996). Effect of Coronary Artery Diameter in Patients Undergoing Coronary Bypass Surgery. *Circulation* 93, 652–655.

- Ohta, S., Komori, K., Yonemitsu, Y., Onohara, T., Matsumoto, T., and Sugimachi, K. (2002). Intraluminal gene transfer of endothelial cell-nitric oxide synthase suppresses intimal hyperplasia of vein grafts in cholesterol-fed rabbit: A limited biological effect as a result of the loss of medial smooth muscle cells. *Surgery* 131, 644–653.
- Olearchyk, A.S. (1988). Vasilii I. Kolesov. A pioneer of coronary revascularization by internal mammary-coronary artery grafting. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 96, 13–18.
- Otsuka, F., Yahagi, K., Sakakura, K., and Virmani, R. (2013). Why is the mammary artery so special and what protects it from atherosclerosis? *Ann. Cardiothorac. Surg.* 2, 519.
- Ozturk, N., Sucu, N., Comelekoglu, U., Yilmaz, B.C., Aytacoglu, B.N., and Vezir, O. (2013). Pressure applied during surgery alters the biomechanical properties of human saphenous vein graft. *Heart Vessels* 28, 237–245.
- Parang, P., and Arora, R. (2009). Coronary vein graft disease: Pathogenesis and prevention. *Can. J. Cardiol.* 25, e57–e62.
- Pober, J.S. (2002). Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Res. Ther.* 4, 1.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M., and Moncada, S. (1990). An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 5193–5197.
- Ramos, J.R., Berger, K., Mansfield, P.B., and Sauvage, L.R. (1976). Histologic fate and endothelial changes of distended and nondistended vein grafts. *Ann. Surg.* 183, 205.
- Rao, G.N., and Berk, B.C. (1992). Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ. Res.* 70, 593–599.
- Robertson, K.E., McDonald, R.A., Oldroyd, K.G., Nicklin, S.A., and Baker, A.H. (2012). Prevention of coronary in-stent restenosis and vein graft failure: Does vascular gene therapy have a role? *Pharmacol. Ther.* 136, 23–34.
- Romero-Calvo, I., Ocón, B., Martínez-Moya, P., Suárez, M.D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustín, O., and de Medina, F.S. (2010). Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal. Biochem.* 401, 318–320.
- Roth, J.A., Cukingnan, R.A., Brown, B.G., Gocka, E., and Carey, J.S. (1979). Factors influencing patency of saphenous vein grafts. *Ann. Thorac. Surg.* 28, 176–183.
- Roubos, N., Rosenfeldt, F.L., Richards, S.M., Conyers, R.A., and Davis, B.B. (1995). Improved preservation of saphenous vein grafts by the use of glyceryl trinitrate–verapamil solution during harvesting. *Circulation* 92, 31–36.
- Sasaki, Y., Suehiro, S., Becker, A.E., Kinoshita, H., and Ueda, M. (2000). Role of endothelial cell denudation and smooth muscle cell dedifferentiation in neointimal formation of human vein grafts after coronary artery bypass grafting: therapeutic implications. *Heart* 83, 69–75.

- Schaeffer, U., Tanner, B., Strohschneider, T., Stadtmüller, A., and Hannekum, A. (1997). Damage to Arterial and Venous Endothelial Cells in Bypass Grafts Induced by Several Solutions Used in Bypass Surgery. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 45, 168–171.
- Sellke, F.W., Boyle, E.M., and Verrier, E.D. (1997). The pathophysiology of vasomotor dysfunction. *Ann. Thorac. Surg.* 64, S9–S15.
- Shukla, N., and Jeremy, J.Y. (2012). Pathophysiology of saphenous vein graft failure: a brief overview of interventions. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 114–120.
- Sianos, G., Morel, M.-A., Kappetein, A.P., Morice, M.-C., Colombo, A., Dawkins, K., van den Brand, M., Van Dyck, N., Russell, M.E., Mohr, F.W., et al. (2005). The SYNTAX Score: an angiographic tool grading the complexity of coronary artery disease. *EuroIntervention* 1, 219–227.
- Southerland, K.W., Frazier, S.B., Bowles, D.E., Milano, C.A., and Kontos, C.D. (2013). Gene therapy for the prevention of vein graft disease. *Transl. Res.* 161, 321–338.
- Souza, D.S., Bomfim, V., Skoglund, H., Dashwood, M.R., Borowiec, J.W., Bodin, L., and Filbey, D. (2001). High early patency of saphenous vein graft for coronary artery bypass harvested with surrounding tissue. *Ann. Thorac. Surg.* 71, 797–800.
- Souza, D.S., Dashwood, M.R., Tsui, J., Filbey, D., Bodin, L., Johansson, B., and Borowiec, J. (2002). Improved patency in vein grafts harvested with surrounding tissue: results of a randomized study using three harvesting techniques. *Ann. Thorac. Surg.* 73, 1189–1195.
- Souza, D.S.R., Johansson, B., Bojö, L., Karlsson, R., Geijer, H., Filbey, D., Bodin, L., Arbeus, M., and Dashwood, M.R. (2006). Harvesting the saphenous vein with surrounding tissue for CABG provides long-term graft patency comparable to the left internal thoracic artery: Results of a randomized longitudinal trial. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 132, 373–378.e5.
- Statistisches Bundesamt (2014). Todesursachen in Deutschland 2013. p. 46.
- Steinberg, D. (2008). The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. *J. Lipid Res.* 50, S376–S381.
- Sullivan, J.M., El-Zeky, F., Vander Zwaag, R., and Ramanathan, K.B. (1997). Effect on Survival of Estrogen Replacement Therapy After Coronary Artery Bypass Grafting. *Am. J. Cardiol.* 79, 847–850.
- Tatoulis, J., Buxton, B.F., and Fuller, J.A. (2011). The Right Internal Thoracic Artery: The Forgotten Conduit—5,766 Patients and 991 Angiograms. *Ann. Thorac. Surg.* 92, 9–17.
- Thatte, H.S., and Khuri, S.F. (2001). The coronary artery bypass conduit: I. Intraoperative endothelial injury and its implication on graft patency. *Ann. Thorac. Surg.* 72, S2245–S2252.
- The Post Coronary Artery Bypass Graft Trial Investigators, C. (1997). The effect of aggressive lowering of low-density lipoprotein cholesterol levels and low-dose anticoagulation on obstructive changes in saphenous-vein coronary-artery bypass grafts. *N Engl J Med* 336, 153–162.

- Tsakok, M., Montgomery-Taylor, S., and Tsakok, T. (2012). Storage of saphenous vein grafts prior to coronary artery bypass grafting: is autologous whole blood more effective than saline in preserving graft function? *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 15, 720–725.
- Tsui, J.C.S., Souza, D.S.R., Filbey, D., Karlsson, M.G., and Dashwood, M.R. (2002). Localization of nitric oxide synthase in saphenous vein grafts harvested with a novel “no-touch” technique: Potential role of nitric oxide contribution to improved early graft patency rates. *J. Vasc. Surg.* 35, 356–362.
- Varnauskas, E., Olsson, S.B., Frizén, M., Carlström, E., Peterson, L.E., and Palm (1979). Coronary-artery bypass surgery in stable angina pectoris: Survival at two years. European Coronary Surgery Study Group. *Lancet* 1, 889–893.
- Verrier, E.D., and Boyle, E.M. (1996). Endothelial cell injury in cardiovascular surgery. *Ann. Thorac. Surg.* 62, 915–922.
- Viaro, F., Capellini, V.K., Celotto, A.C., Carlotti, C.G., Rodrigues, A.J., Reis, G.S., dos Santos Augusto, V., and Evora, P.R.B. (2010). Immunohistochemical evaluation of three nitric oxide synthase isoforms in human saphenous vein exposed to different degrees of distension pressures. *Cardiovasc. Pathol.* 19, e211–e220.
- Vineberg, A., and Miller, G. (1951). Internal mammary coronary anastomosis in the surgical treatment of coronary artery insufficiency. *Can. Med. Assoc. J.* 64, 204–210.
- Wang, X.-W., Zhao, X.-J., and Xiang, X.-Y. (2013). Gene Therapy for Vein Graft Failure: Gene therapy for vein graft restenosis. *J. Card. Surg.* 28, 144–147.
- Windecker, S., Kolh, P., Alfonso, F., Collet, J.-P., Cremer, J., Falk, V., Filippatos, G., Hamm, C., Head, S.J., Juni, P., et al. (2014). 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization: The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur. Heart J.* 35, 2541–2619.
- World Health Organization (2010). WHO | Global status report on noncommunicable diseases 2010.
- World Health Organization (2014). Global status report on noncommunicable diseases 2014: attaining the nine global noncommunicable diseases targets; a shared responsibility. (Geneva: World Health Organization).
- Yusuf, S., Zucker, D., Peduzzi, P., Fisher, L.D., Takaro, T., Kennedy, J.W., Davis, K., Killip, T., Passamani, E., and Norris, R. (1994). Effect of coronary artery bypass graft surgery on survival: overview of 10-year results from randomised trials by the Coronary Artery Bypass Graft Surgery Trialists Collaboration. *Lancet* 344, 563–570.

7.5 Material

7.5.1 Geräte

Gerät	Hersteller	Produktbezeichnung (Artikelnummer)
Autoklav	Systec GmbH Linden, D	Systec VX-95
Eismaschine	Manitowoc GmbH Herborn, D	Flockeneisbereiter RF
Elektrophorese-Zelle	BioRad Laboratories GmbH München, D	Criterion™-Cell
Elektrophorese - Spannungswandler	BioRad Laboratories GmbH München, D	PowerPac™ Basic Power Supply
ELISA-Lesegerät	TECAN Group Ltd. Männedorf, CH	Infinite® 200 Pro series
Kryostat	Leica Biosystems GmbH Nussloch, D	Leica CM 1950
Kugel- Schwingmühle	Retsch GmbH Haan, D	Schwingmühle MM301
Lichtmikroskop	Leica Microsystems GmbH Wetzlar, D	Leica DM1000 LED
Okkular	Leica Microsystems GmbH Wetzlar, D	HC 10x/20
Objektive	Leica Microsystems GmbH Wetzlar, D	- HI PLAN 4x/0.10 - HI PLAN 10x/0.25 PH1
Lichtmikroskop mit Fluoreszenz	Leica Microsystems GmbH Wetzlar, D	Leica DM4000 B LED
Kamera	Leica Microsystems GmbH Wetzlar, D	Leica DFC420 C
Externe Lichtquelle	Leica Microsystems GmbH Wetzlar, D	Leica EL6000
Okkular	Leica Microsystems GmbH Wetzlar, D	HC PLAN S 10x/25 M (11507808)
Objektive	Leica Microsystems GmbH Wetzlar, D	HC PL FLUOTAR 1.6x/0.05 HC PL FL 10x/0.30 PH1 HCX PL FL 20x/0.50 PH2 HCX PL APO 40x/1.25 OIL HCX PL APO 63x/1.4-0.60
Magnetrührer	Heidolph GmbH Schwabach, D	Magnetrührer MR 3001
Mikrozentrifuge	NeoLab GmbH Heidelberg, D VWR International GmbH Radnor, PA, USA Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA	neoLab Mini-Zentrifuge (D- 6015) VWR Galaxy Mini Centrifuge Heraeus Fresco Microcentrifuge

Molekularimager	BioRad Laboratories GmbH München, D	Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ System
pH-Meter	SI Analytics GmbH Mainz, D	Messgerät Lab850
PCR-Werkbank	Erlab DFS SAS Köln, D	- CaptairBio - CaptairFlex 321
Pipetten	Eppendorf AG Hamburg, D	Pipette Research® Plus - 10µl (120000020) - 100µl (3120000046) - 200µl (3120000054) - 1000µl (3120000062)
Pipettierhilfe (Akku-betrieben)	Hirschmann GmbH Eberstadt, D	Pipetus® (9907200)
Protein - Transferkammer	BioRad Laboratories GmbH München, D	Trans-Blot® Turbo™ Transfer System
Real-Time PCR-Geräte	BioRad Laboratories GmbH München, D	- C1000 Touch™ Thermal Cycler - CFX96 Real-Time PCR Detection System
RNA-Aufbereitung	Qiagen GmbH Hilden, D	QIAcube (9001885)
Spektrophotometer	Peglab Biotech GmbH Erlangen, D	NanoDrop ND-1000
Steril-Werkbank	Heraeus Holding GmbH Hanau, D	LaminAir HLB 2448GS
Temperierbad	IKA®-Werke GmbH Staufen, D	Temperierbad TE-2
Thermocycler	SensoQuest GmbH Göttingen, D	Labcycler (011-101)
Timer	Eppendorf AG Hamburg, D	Oregon Scientific Clock Timer TR118
Tischzentrifuge	Eppendorf AG Hamburg, D	Centrifuge 5430 R Centrifuge 5415 D
Vortex Mixer	VWR International GmbH Radnor, PA, USA IKA®-Werke GmbH Staufen, D	Reagenzglasschüttler (444-1372) Vortexer IKA VF2
Waage	Mettler-Toledo GmbH Greifensee, CH	PE 3600 DeltaRange
Wärmeschrank	Memmert GmbH & Co. KG Schwabach, D	Universalschrank UM100
Wasseraufbereitung	Thermo Electron GmbH Niederelbert, D	TKA GenPure xCad (082217)

7.5.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Produktbezeichnung (Artikelnummer)
96-Well Platte (PCR)	Peqlab Biotech GmbH Erlangen, D	Skirted 96 Well PCR Plate (82-0800-A)
Aluminiumhalterung (Kryostat)	Wekon Schnedler GmbH Rosbach, D	Spezielle Anfertigung
Einfrierröhrchen	Greiner Bio One GmbH Kremsmünster, AT	Cryo.s™ 1ml (123277)
Deckgläser	VWR International GmbH Radnor, PA, USA	Deckglas 24x50mm (631-1574)
	Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, D	Deckglas 24x50mm (1871.2)
Einbettkassette	Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, D	Einbettkassette Macro (EE16.1)
Einbettmedium	Sakura Finetek GmbH Staufen, D	Tissue-Tek® O.C.T.™ (4583)
Einbettgeschälchen	Sakura Finetek GmbH Staufen, D	Tissue-Tek® Cryomold® (4566)
Einmal-Pipette	Greiner Bio One GmbH Kremsmünster, AT	Serum Pipette (612361)
Fettstift	Vector Laboratories Ltd. Peterborough, UK	ImmEdge™ Pen (H-4000)
Glaspipette	Hirschmann GmbH Eberstadt, D	Pasteurpipette (9250101)
Haftfolie (PCR)	BioRad Laboratories GmbH München, D	Microseal® 'B' Adhesive Sealer (MSB-1001)
Klemme	Fine Science Tools GmbH Heidelberg, D	Mosquito Klemme, gerade (13008-12)
Kompressen	Paul Hartmann AG Heidenheim, D	ES-Kompressen 10x10cm (407835)
	Lohmann & Rauscher GmbH, Neuwied, D	Gazin® Kompressen 10x10cm (18507)
Mahlkugel	Retsch GmbH, Haan, D	Grinding Balls - Ø 3mm (22.455.0002) - Ø 5mm (22.455.0003)
Mikroskopieröl	Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, D	Immersion Liquid Type N (11513860)
Mikrotommesser	Leica Biosystems GmbH Nussloch, D	Mikrotom Einwegklingen Leica 819
Nitrozellulose- Blotting	BioRad Laboratories GmbH München, D	Trans-Blot® Turbo™ Midi Nitrocellulose Transfer Pack (170-4159)
Objektträger	VWR International GmbH Radnor, PA, USA	VWR® Superfrost® Plus (631-0108DE)

PCR-Tubes	Peqlab Biotech GmbH Erlangen ,D	QPCR Tube Strips 0.2 ml (82-1502-A)
Petrischalen	Greiner Bio One GmbH Kremsmünster, AT	Cellstar® 60/15 mm (628160)
Pinzette	B. Braun - Aesculap AG Tuttlingen, D	Anatomische Pinzette, breit (BD077R)
	Fine Science Tools GmbH Heidelberg, D	Tissue Forceps (11021-12)
Pipette	Greiner Bio One GmbH Kremsmünster, AT	Serological Pipette (760180)
Pipetten-Spitzen	Peqlab Biotech GmbH Erlangen ,D	SaveGuard Filterspitzen (81-1011, -1012, -1050)
	Eppendorf AG Hamburg, D	ep Dualfilter T.I.P.S.® SealMax (0030077806, -14, -30, -57)
	Roth GmbH & Co.KG Karlsruhe, D	MultiFlex® Tips (Y419.1)
Schere (gebogen)	B. Braun - Aesculap AG Tuttlingen, D	Iris-/Fadenschere (BC141R)
	Fine Science Tool GmbH Heidelberg, D	Strabismus Schere (14074-09)
SDS-Gel	BioRad Laboratories GmbH München, D	Criterion™ TGX™ Gel (567-1094)
Skalpell	B. Braun - Aesculap AG Tuttlingen, D	Surgical Disposable Scalpels (BA221)
Splitterpinzette	B. Braun - Aesculap AG Tuttlingen, D	Anatomische Pinzette, fein (BD312R)
Tubes	Eppendorf AG Hamburg, D	Safe-Lock Tubes -1,5ml ambra (0030120191) -2,0ml (0030123344)
Vasoshield	Maquet AG Rastatt, D	VASOSHIELD Spritze

7.5.3 Chemikalien, Reagenzien, Lösungen und Kits

Chemikalien & Reagenzien	Hersteller	Produktbezeichnung (Artikelnummer)
Ace Glow - Chemilumineszenz	Peqlab Biotech GmbH Erlangen, D	AceGlow Chemilumineszenz - Solution A: Luminol/Verstärker - Solution B: Peroxidpuffer
Aceton	Roth GmbH & Co. KG	Aceton ≥99,7% (CP40.4)
Silane(Aminopropylthiethoxysilane)	Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, D	Silane ≥98% (A3648)

BSA (Rinderserum Albumin)	Roth GmbH & Co. KG	Albumin Fraktion V, ≥98% (8076.2)
Spüllösung	B. Braun AG Melsungen, D	Aqua B. Braun
Cell & Tissue Staining Kit	R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, USA	Anti-Mouse HRP-AEC System (CTS003) - Peroxidase Blocking Reagenz - Serum Blocking Reagenz - Avidin Blocking Reagenz - Biotin Blocking Reagenz - Biotiniliierter Sekundär-AK - HSS-HRP - AEC-Chromogen
DAPI (4',6-Diamidin-2- phylindol)	Thermo Fisher Inc Karlsbad, CA, USA	DAPI Nucleic Acid Stain (D1306)
Desinfektionslösung (Präparationsbesteck)	Dr. Weigert® GmbH Hamburg, D	Neodisher® Septo PreClean
DNase- Dekontamination	AppliChem GmbH Darmstadt, D	DNA-ExitusPlus™ (A7089.0500)
Na₂HPO₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, D	Na ₂ HPO ₄ ≥99% (P030.1)
EDTA (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂ x 2H₂O)	Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, D	Ethylendiamintetraessigsäure (E5134)
Elektrophorese- Standard	BioRad Laboratories GmbH; München, D	Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards (161- 0376)
Entellan® (Eindeckelmedium)	Merck KGaA Darmstadt, D	Enellan® Neu (1079610500)
Eosin	Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, D	Eosin G-Lösung 0,5% (X883.2)
Ethanol	Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, D	Ethanol vergällt, ≥99,8% (K928.4)
Hämalaune	Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, D	Hämatoxylin-Lösung Gill No. 1 (GHS116)
HCL (Salzsäure)	Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, D	HCL ≥25% (6331.1)
KCL (Kaliumchlorid)	Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, D	KCL ≥99,5% (6781.1)
KH₂PO₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, D	KH ₂ PO ₄ ≥99% (3904.2)
Laufpuffer	BioRad Laboratories GmbH; München, D	Tris/Glycine/SDS Buffer (161-0732)
Lowry Protein Assay	BioRad Laboratories GmbH München, D	DC™ Protein Assay Kit II (500-0112) - Reagenz A: alk. Kupfertartrat - Reagenz B: Folin-Reagenz - Reagenz S
Magermilchpulver	BioRad Laboratories GmbH; München, D	Blocking-Grade Blocker (170-6404)

2-Mercapto-Ethanol	Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, D	2-Mercapto-Ethanol (M-7154)
Mowiol® 4-88 (Eindeckelmedium)	Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, D	Polyvinylalkohol 4-88 (81381)
NaOH (Natriumhydroxic)	Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, D	Natriumhydroxid ≥98% (P031.2)
Paraformaldehyd (PFA)	Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, D	Paraformaldehyd, reinst, DAC (0335.2)
PCR Master Mix	Life Technologies GmbH Darmstadt, D	- TaqMan Gene Expression Master Mix (4369016) - Power SYBR® Green PCR Master Mix (4367659)
PIPES (C₈H₁₈N₂O₆S₂)	Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, D	Pufferan® ≥99% (9156.2)
Ponceau	Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, D	PonceauS Solution (P7170)
Protease Inhibitor	La Roche AG Basel, CH	Roche cOmplete Mini Tablette, EDTA-frei (1836170)
Reduktionsmittel	Invitrogen AG Carlsbad, CA, USA	NuPAGE® Sample Reducing Agent - 10X (NP0004)
Reverse Transkription Kit	Invitrogen AG Carlsbad, CA, USA	- dNTP Set (10297-018) - Random Primers (48190-011) - RNaseOUT™ Recombinant Ribonuklease Inhibitor (10777-019) - SuperScript® II Reverse Transcriptase (18064-014)
RNA-Isolierung	QIAGEN GmbH Hilden, D	- RNeasy Mini Kit (74106) - RNeasy Mini Spin Column - RNase freies H ₂ O - RLT-Puffer - RW1-Puffer - RPE-Puffer - RNase freies DNase Set
RNase- Dekontamination	AppliChem GmbH Darmstadt, D	RNase-ExitusPlus™ (A7153.0500)
StrepTactin	BioRad Laboratories GmbH; München, D	Precision Protein™ StrepTactin-HRP Konjugat
Sucrose (Saccharose)	Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, D	Sucrose (S1888)
TRIS-Base	Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, D	Trizma® Base (T1503)
Tween (Immunoblotting)	Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, D	Tween® 20
Xylol	Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, D	Xylol Rotipuran® (4436.1)

7.5.4 Software/EDV-Programme

Bezeichnung	Hersteller	Produktbezeichnung
Abbildungen	AutoDesk Inc. Mill Valley, CA, USA	SketchBook Express 6
ELISA-Analyse	TECAN Group Ltd. Männedorf, CH	Magellan™ (Version 7.1)
Fluoreszenzmikroskopie	Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, D	Leica Application Suite (Version 3.8)
Gel-Auswertung	BioRad Laboratories GmbH; München, D	ChemiDoc XRS+ Systems Image Lab (Version 4.1)
Immunhistologie	National Institutes of Health; USA	ImageJ (Version 1.48)
Literaturverwaltung	Center for History & New Media, Fairfax, VA, USA	Zotero (Version 4)
PCR Analyse/Auswertung	BioRad Laboratories GmbH; München, D	CFX Manager (Version 3)
RNA-Konzentration Bestimmung	Peglab Biotech GmbH Erlangen, D	NanoDrop 1000 (Version 3.81)
Statistik	IBM Deutschland GmbH Ehningen, D	SPSS Statistics (Version 22)
Tabellenkalkulation	Microsoft Corp. Redmond, WA, USA	Excel für Macintosh 2015 (Version 15.13.4)
Textverarbeitung	Microsoft Corp. Redmond, WA, USA	Word für Macintosh 2015 (Version 15.13.4)

7.5.5 Antikörper

7.5.5.1 Primär-AK Immunhistologie

Primär-AK	Hersteller	Klon (Artikelnummer)	Art (Wirt)	Konz.
CD31 (PECAM1)	R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, USA	9G11 (BBA7)	Monoklonaler IgG1 (Maus)	1:100
eNOS	Abcam AG, Cambridge, UK	6H2 (ab91205)	Monoklonaler IgG1 (Maus)	1:100
ICAM-1 (CD54)	Santa Cruz Biotech Inc.; Dallas, TX, USA	15.2 (sc-107)	Monoklonaler IgG1 (Maus)	1:100
P-Selectin (CD62P)	BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA	AC1.2 (556087)	Monoklonaler IgG1 (Maus)	1:100

7.5.5.2 Sekundär-AK Immunhistologie

Sekundär-AK	Hersteller	Klon (Artikelnummer)	Art (Wirt)	Konz.
Cy3 (rot)	Merck KGaA Darmstadt, D	- (AP192C)	Anti-Maus IgG1 (Donkey)	1:300

7.5.5.3 Primär-AK Western-Blot

Primär-AK	Hersteller	Klon (Art.-Nr.)	MW [kDa]	Art (Wirt)	Konz.
eNOS	Abcam AG, Cambridge, UK	6H2 (ab9120)	133	Monoklonaler IgG1 (Maus)	1:500
ICAM-1 (CD54)	Santa Cruz Biotech Inc.; Dallas, TX, USA	15.2 (sc-107)	85-115	Monoklonaler IgG1 (Maus)	1:200
P-Selectin (CD62P)	BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA	AC1.2 (556087)	140	Monoklonaler IgG1 (Maus)	1:1000
GAPDH	Cell Signaling Technology Inc. Camebridge, UK	14C10 (3683s)	37	Monoklonaler IgG <u>HRP-konjugiert</u> (Hase)	1:1000

Abkürzungen: MW = Molekulargewicht, kDa = Kilodalton.

7.5.5.4 Sekundär-AK Western-Blot

Sekundär-AK	Hersteller	Klon (Artikelnummer)	Art (Wirt)	Konz.
ECL Anti-Maus AK	GE Healthcare GmbH Solingen, D	- (NA931)	Anti-Maus IgG, <u>HRP-gekoppelt</u> (Schaf)	1:5000

7.5.6 **Primer zur Normalisierung der PCR**

Primer	Firma	GC-Gehalt	PL (bp)	AL (bp)	AT
18-S	Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, D	50%	20	67	60 °C
	Sequenz	Forward	5'-CCGCAGCTAGGAATAATGGA-3'		
		Reverse	5'-CCCTCTTAATCATGGCCTCA-3'		

Abkürzungen: bp = Basenpaare, GC = Guanin und Cytosin Basen, PL = Primer-Länge, AL = Amplikon-Länge, AT = Anlagerungs-Temperatur; A = Adenosin, C = Cytosin, T = Tyrosin, G = Guanin.

7.5.7 Taq-Man® Real-Time PCR Assays

Gen	NOS3 (eNOS)	SELP (CD62P)	ICAM1 (CD54)	VCAM1 (CD 106)
Entrez-ID	4846	6403	3383	7412
Spezies	Human	Human	Human	Human
Exon- Anzahl	30	18	7	9
Genort	7q36	1q22-q25	19p13.3-p13.2	1p32-p31
ID-Nummer	Hs01574659_m 1	Hs00927900_m 1	Hs00277001_m 1	Hs00365486_m 1
Amplikon- länge	107	65	138	122

Alle verwendeten Taq-Man® Assays stammen von der Firma Life Technologies GmbH (Darmstadt, D). Alle Kits verwenden Hydrolyse-Sonden mit dem Donorfarbstoff FAM und dem Quencher TAMRA zur Messung während der Real-Time PCR.

Abkürzungen: ID = Identifikationsnummer, CD = Cluster of Differentiation, eNOS = endotheliale Stickstoff-Synthase, SELP = P-Selectin, ICAM 1 = Intercellular Adhesion Molecule, VCAM 1 = Vascular Cell Adhesion Molecule.

7.5.8 Lösungen/Puffer

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

Zur Herstellung der PBS-Lösungen wurden 397,4 g NaCl, 10 g KCl, 10 g KH_2PO_4 sowie 10 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 5l Aqua dest. gelöst. Von dieser Stock-Lösung wurden anschließend 500 ml mit 4,5 Aqua dest. vermengt und mittels 10 molarer Natronlauge (NaOH) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Mowiol 4-88

Für das Eindeckelmedium wurden 200 ml PBS (pH-Wert 8,0) mit 50 g Mowiol 4-88 vermischt und 16 h durchweg gerührt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 25 ml wasserfreies Glycerin hinzugefügt und erneut für 16 h gerührt. Es folgte eine Zentrifugation bei 12000 rpm für 15 min bei 4 °C. Abschließend konnte der Überstand in ein frisches Gefäß übertragen und bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert werden.

4%-ige Formaldehyd-Lösung (PFA)

1l PBS wurde mit 100 ml ddH_2O im Verhältnis 9:1 vermischt. Im nächsten Schritt wurden 40 g Paraformaldehyd (Pulver) abgewogen und mit der PBS- ddH_2O -Lösung unter stetigem Rühren mit einem Rührmagneten gelöst. Anschließend wurden NaOH-

Linsen hinzugegeben und solange gemixt, bis die Flüssigkeit klar wurde. Im letzten Schritt wurde der pH-Wert mit einer Quetschpipette unter tröpfchenweiser Zugabe von HCl auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde dann bei – 20 °C bis zum Gebrauch eingefroren.

Präparationspuffer (Western-Blot)

Zur Herstellung von 100 ml Präparationspuffers zur Proteinaufarbeitung vor Durchführung des Western-Blots wurden 10,27 g Saccharose (300 mM), 0,6 g PIPES (Piperazin-N,N'-bis-2-ethansulfonsäure, 1 mM), 0,37 g EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure, 10 mM) und 0,78 g NaH₂PO₄ x H₂O (Dinatriumhydrogenphosphat, 50 mM) abgewogen und in ca. 80 ml ddH₂O gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit NaOH auf 7,4 eingestellt und die Lösung mit ddH₂O auf 100 ml Volumen aufgefüllt. Dann wurde der Puffer in neue Tubes abgefüllt, in je 10 ml eine Roche cOmplete-Tablette (EDTA-frei, Protease Inhibitor) gelöst und die Tubes im letzten Schritt bis zur Verwendung bei – 20 °C eingefroren.

SDS-Tris-Glycin-Ladepuffer 4-fach (Western-Blot)

Zur Herstellung von 10 ml des Ladepuffers wurden 2,5 ml von 1M Tris-HCL (pH 6,8) mit 0,5 ml ddH₂O, 1,0 g SDS (Sodiumdodecylsulfat), 4 ml 100%-iges Glycerol, 0,8 ml von 0,1% Bromophenol Blue (BPB, Tetrabromophenolsulfonphthalein) und 2 ml von 14,3 M Beta-Mercaptoethanol vermischt und anschließend mit ddH₂O auf 10 ml Volumen aufgefüllt.

TBST-Waschpuffer (Western-Blot)

Zur Herstellung einer 10-fachen TBS-Stocklösung wurden 121,14 g TRIS-Base (1 M) und 90 g NaCl (9%-ig) in ddH₂O gelöst und mithilfe von HCl auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. Zur Verwendung als Waschpuffer beim Western-Blot wurden die TBS-Stocklösung mit Aqua dest. 10-fach verdünnt und zusätzlich 0,1% Tween (Polyoxyethylensorbitan monolaurat) hinzugegeben.

Desinfektions-Lösung für Instrumente

Zur Desinfektion des Präparationsbestecks wurde 15ml der Neodisher® Septo PreClean Lösung mit 1l enthärtetem H₂O vermischt. Hierin wurden die Instrumente 15 min eingelegt, anschließend mit ddH₂O abgespült und abschließend für die nächste Benutzung autoklaviert.

7.6 Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt.

Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert.

Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

7.7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Schönburg für die Bereitstellung dieses interessanten Themas sowie die schnelle Durchsicht meiner Arbeit.

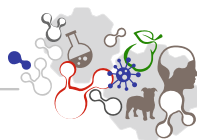
Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Mani Arsalan für die enge und ausdauernde Betreuung sowie das regelmäßige und konstruktive Feedback.

Den Mitarbeitern des Franz-Grödel-Instituts um PD Dr. phil. nat. Christian Troidl danke ich für die Zurverfügungstellung eines Arbeitsplatzes im Labor sowie für die tatkräftige Unterstützung und wissenschaftlich fundierten Hilfestellungen.

Dem Team des Franz-Grödel-Instituts, besonders hierbei Frau Anett Kirchhoff und Frau Monika Rieschel, danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Zudem danke ich von ganzem Herzen meiner Familie für die Unterstützung und zusätzliche Motivation zur Fertigstellung dieser Arbeit. Besonderer Dank gebührt hierbei meiner Ehefrau.

Die vorliegende Arbeit widme ich meiner Familie in Dankbarkeit.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN**

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6617-8



9 783835 966178